

Tesis de Posgrado

Efecto de la progesterona y del acetato de medroxiprogesterona (MPA) sobre el crecimiento de fibrosarcomas murinos : Estudios in vivo e in vitro

Lanari, Claudia Lee Malvina

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lanari, Claudia Lee Malvina. (1985). Efecto de la progesterona y del acetato de medroxiprogesterona (MPA) sobre el crecimiento de fibrosarcomas murinos : Estudios in vivo e in vitro. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1898_Lanari.pdf

Cita tipo Chicago:

Lanari, Claudia Lee Malvina. "Efecto de la progesterona y del acetato de medroxiprogesterona (MPA) sobre el crecimiento de fibrosarcomas murinos : Estudios in vivo e in vitro". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1898_Lanari.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**EFFECTO DE LA PROGESTERONA
Y DEL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA)
SOBRE EL CRECIMIENTO DE FIBROSARCOMAS MURINOS:
ESTUDIOS IN VIVO E IN VITRO**

Autora: CLAUDIA LEE MALVINA LANARI

Directora: Dra. CHRISTIANE DOSNE PASQUALINI

Lugar de trabajo:

**SECCION LEUCEMIA EXPERIMENTAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLOGICAS
ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA**

Tesis presentada para optar al título de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

Reg-2 1898

BUENOS AIRES 1985

*Depos 1898
Ej. 2*

Isolation of Progesterone Forty years ago.
Amer. J. Obstet. Gynecol., 120: 137, 1974

...Nature had let us find one key to its secret and new horizons seemed to open up. But it was that first sight of the sparkling, glittering crystals in the retort that we will always remember, that moment of bliss for which the scientist would give a thousand days...

Aislamiento de la progesterona hace cuarenta años.
Amer. J. Obstet. Gynecol., 120: 137, 1974

...La Naturaleza nos había permitido encontrar una llave para sus secretos y nuevos horizontes parecían abrirse. Pero lo que recordaremos siempre fue la primera vez que vimos los chispeantes y brillantes cristales, ese momento de felicidad por el cual el científico daría mil de sus días...

A. Butenandt, V. Westphal

A MI PADRE

con quien tuve la suerte de
poder discutir y compartir
estos resultados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo, realizado en la Sección Leucemia Experimental del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina, en mi carácter de becaria del CONICET, ha sido posible gracias al apoyo de diferentes personas e instituciones a quienes deseo expresar mi agradecimiento:

A la Dra Christiane Dosne Pasqualini, por su constante estímulo y la generosa dedicación de su tiempo desde mis comienzos en la investigación científica y muy especialmente durante el desarrollo de este trabajo;

Al Dr Alfredo Molinolo por su estrecha colaboración en los estudios histológicos y en la discusión de los resultados obtenidos;

A la Dra María Marta E. de Bracco por su entusiasmo y estrecha colaboración en los estudios in vitro;

Al Dr S.L. Rabasa, Asesor científico de la Sección Leucemia Experimental por su colaboración en el análisis de los resultados obtenidos;

A la Dra Frida Bergmann por su colaboración en el análisis estadístico de los resultados;

A los Dres Alicia Roldán y Carlos Lantos por el suministro del cortisol y de la dexametasona y por su valioso aporte en la discusión de los resultados;

A los Sres Juan Portaluppi, Antonio Morales y Alicia Sens por su invalorable asistencia técnica;

A la Srta Adriana Belloso por su ayuda en la preparación final del manuscrito;

A todos los miembros de la Sección Leucemia Experimental por su colaboración y afecto;

A los miembros de la Sección Inmunología y en especial a la Lic. Silvia Cangiani quienes me dejaron compartir su laboratorio y sus materiales para cultivo de tejidos;

A la Casa Schering Argentina por la donación de 4a progesterona y a Upjohn y Farmitalia por el parcial suministro del acetato de medroxiprogesterona;

Al CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) y a FUNDALEU (Fundación para combatir la leucemia) por su apoyo económico;

A mi marido y a mis hijos quienes sin darse cuenta también colaboraron en la realización de este trabajo.

<u>INTRODUCCION</u>	1
OBJETIVO	2
I PROGESTERONA	3
1. Secreción y metabolismo.....	3
2. Mecanismos de acción.....	5
a. Genómicos.....	5
b. No genómicos.....	7
3. Actividad antihormonal de la progesterona.....	7
a. Actividad antiestrogénica de la proges- terona.....	7
b. Actividad antiandrogénica de la proges- terona.....	8
c. Actividad antialdosterona de la proges- terona	9
4. Progestágenos sintéticos.....	9
II TUMORES.....	11
1. Tumores hormonodependientes.....	11
a. Uso de la progesterona y del acetato de me- droxiprogesterona en tumores hormonodepen- dientes.....	13
b. Distintas hipótesis que explicarían la acti- vidad antitumoral del MPA.....	13
i. Efecto directo sobre las células tumora- les.....	13
ii. Efecto androgénico directo.....	15
iii. Actividad glucocorticoide directa o me- diada por un producto metabólico del MPA.....	16
iv. Efecto antigonadotrópico.....	16
2. Tumorigénesis por cuerpo extraño.....	16
a. Etapas de la reacción por cuerpo extraño.....	18
b. Factores hormonales que influyen la tu- morigénesis inducida por un cuerpo extraño ..	20
III DESARROLLO DE LAS FIBROSIS.....	22
1. Progesterona y fibrosis	24

<u>MATERIALES Y METODOS</u>	28
I. ESTUDIOS IN VIVO	29
1. Animales.....	29
2. Tumores de trasplante.....	29
a. Fibrosarcoma (Px).....	29
b. Leucemia linfoide (LB).....	29
c. Carcinoma epidermoide indiferenciado (CEI)...	29
3. Administración de progesterona y MPA.....	30
a. Progesterona en esponja.....	30
b. Progesterona y MPA dentro de un tubito de si- lastic	30
c. Acetato de medroxiprogesterona en suspensión de microcristales	31
4. Tumorigénesis por cuerpo extraño.....	31
5. Estudios estadísticos	32
II. ESTUDIOS IN VITRO	33
1. Medios de cultivo	33
2. Despegado de células	33
3. Cultivos celulares	33
a. Cultivo primario de fibroblastos embrionarios murinos.....	33
b. Cultivo primario de fibroblastos de un fibro- sarcoma murino.....	33
c. Línea celular HELA	34
d. Línea celular WISH	34
4. Prueba de viabilidad celular.....	34
5. Soluciones de esteroides	34
6. Medición de crecimiento celular mediante la téc- nica de incorporación de timidina tritiada (³ H- Tim).....	35
7. Medición del efecto citotóxico	37
8. Estudios de microscopía óptica.....	39

<u>RESULTADOS</u>	40
<u>ESTUDIOS IN VIVO</u>	41
I TUMORES TRANSPLANTADOS	41
1. Fibrosarcoma (Px).....	41
a. Inoculado mediante trócar	41
b. Inoculación de una suspensión celular de fibrosarcoma	45
i. Inóculo tumoral junto con MPA	45
ii. Administración de MPA al día 3 del inó- culo tumoral	45
iii. Administración de MPA al día 7 del inó- culo tumoral	50
2. Leucemia linfoblástica (LB)	50
a. Transplante de LB mediante trócar.....	50
b. Inoculación de una suspensión celular de LB	53
i. Inóculo tumoral junto con MPA	53
ii. Administración de MPA al día 3 del inó- culo tumoral	53
3. Carcinoma epidermoide indiferenciado (CEI) .	56
a. Inoculación mediante trócar	56
II EFECTO DEL MPA SOBRE LA INDUCCION DE SARCOMAS POR CUERPO EXTRAÑO	58
<u>ESTUDIOS IN VITRO</u>	75
I. EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE EL CRECI- MIENTO DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS Y TUMO- RALES MURINOS, CELULAS WISH Y HELA.....	75
1. Inhibición de incorporación de ³ H-Tim ...	75
a. Fibroblastos embrionarios murinos	75
i. 24 horas de incubación	75
ii. 72 horas de incubación	75
iii. Reversibilidad	79
b. Fibroblastos tumorales murinos (24 ho- ras de incubación	79
c. Células WISH (24 horas de incubación).	79
d. Células HELA (24 horas de incubación).	79

2. Efecto citolítico de la progesterona	87
a. Fibroblastos embrionarios	87
b. Fibroblastos tumorales	92
c. Células WISH	92
d. Células HELA	92
3. Visualización del efecto de la progesterona sobre células en cultivo. Estudios de micros- copia óptica	98
II EFECTO DEL MPA SOBRE EL CRECIMIENTO DE FIBRO- BLASTOS EMBRIONARIOS Y TUMORALES MURINOS Y DE CE- LULAS WISH (Incorporación de ³ H-Tim. 24 horas de incubación).....	98
a. Fibroblastos embrionarios.....	98
b. Fibroblastos tumorales.....	108
c. Células WISH.....	108
III COMPARACION DEL EFECTO DE LA PROGESTERONA CORTI- SOL Y DEXAMETASONA SOBRE LA PROLIFERACION DE FI- BROBLASTOS EMBRIONARIOS.....	108
<u>DISCUSION</u>	117
<u>CONCLUSION</u>	127
<u>RESUMEN</u>	129
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	132

I N T R O D U C C I O N

OBJETIVO

Durante la década del 30, Lipschutz y col (1,2) demostraron que los estrógenos inducen la formación de tumores fibroblásticos uterinos, retroperitoneales y de otras localizaciones cuando se los administran en forma continuada a cobayas ovariectomizadas. En 1950, Nagel (3) los denominó tumores desmoides por su similitud con los tumores desmoides humanos; difieren de los fibromas por su capacidad de infiltrar tejidos adyacentes y además como no originan metástasis era difícil clasificarlos como fibrosarcomas. Cuando los cobayos eran tratados con progesterona se prevenía la formación de estos tumores (1,28,9,10). Muchos años más tarde, en base a estas observaciones, Lanari y col. (4,5,6,7) trataron con progesterona a pacientes con tumores desmoides o fibromatosis agresivas obteniendo resultados muy satisfactorios. Hasta el momento no existe otro tratamiento para las fibrosis salvo en algunos casos la cirugía (11). A pesar de su acción antiinflamatoria, los corticoides en altas dosis (12,13,14) no resultaron útiles para el tratamiento de las fibrosis debido a que sus efectos positivos eran contrabalanceados por efectos colaterales (15,16,17).

En base a estas observaciones y teniendo en cuenta que el acetato de medroxiprogesterona (MPA) es el derivado sintético de la progesterona que se usa en la terapia de tumores hormonodependientes por su mayor facilidad de aplicación (18, 19,20), se decidió estudiar el efecto de este derivado de la progesterona sobre el crecimiento de un fibrosarcoma en el ratón y sobre la incidencia de sarcomas inducidos por un cuerpo extraño en experimentos realizados tanto in vivo como in vitro

1. PROGESTERONA

1. Secreción y metabolismo

La progesterona puede ser considerada la más primitiva de las hormonas esteroideas. Su síntesis a partir del colesterol requiere sólo dos pasos enzimáticos, oxidación y clivaje, para formar pregnenolona que luego es transformada en progesterona. Su secreción comienza justo antes de la ovulación en el folículo que está destinado a ovular (21). También se sintetiza en testículos, corteza adrenal y, en algunas especies, en la placenta. La placenta hemocorial (humanos, primates y roedores) en la cual hay un contacto directo entre sangre materna y tejido fetal, produce una gran cantidad de progesterona mientras que en otros tipos de placenta como la epitelio-cordial (cerdo, cabra y conejo) la producción es escasa (22). La síntesis y secreción de progesterona se encuentran bajo el control de la hormona luteinizante (LH) cuyo efecto estimulante está mediado por el AMPc (23). La progesterona secretada por el cuerpo lúteo es la responsable del desarrollo de un endometrio secretor. Este efecto está mediado por un receptor específico cuya síntesis está inducida por el estradiol secretado en la fase folicular del ciclo menstrual (24). La síntesis del receptor es inhibida por la misma progesterona (25) que impide además la resíntesis de los receptores de estradiol (26). Por estas razones bioquímicas entre otras, la caída abrupta de la progesterona al final del ciclo es el determinante principal del comienzo de la menstruación. Si la duración de la fase lútea es artificialmente prolongada por tratamiento con progesterona, pueden ser inducidos cambios deciduales en el estroma similares a los de la preñez temprana. Cuando ocurre la fecundación, la vida funcional del cuerpo lúteo persiste hasta que el trofoblasto en desarrollo secreta su LH y gonadotrofina coriónica

a la circulación materna. En humanos, durante el segundo o tercer mes de embarazo, la placenta comienza a secretar estrógenos y progesterona reemplazando la función del cuerpo amarillo. Las concentraciones crecientes de progesterona que ocurren en la gestación son de gran importancia para mantener la preñez, particularmente considerando que la misma suprime la contractilidad uterina y que podría contribuir a un estado de "inmunidad de trasplante" previniendo el rechazo inmunológico del feto (27). A pesar de la gran producción de progesterona, su concentración en tejido uterino no es tan alta debido a su metabolismo en el hígado así como también en el endometrio y miometrio (28). En los machos se encuentra una concentración plasmática de 0,3 ng/ml y en las hembras 0,9 ng/ml en la fase folicular y 1,8-15 ng/ml en la fase luteínica (29). En humanos la progesterona es principalmente degradada en el hígado en 5 beta pregnano 3 alfa diol (pregnanediol). Este y otros metabolitos son después conjugados en el hígado con ácido glucurónico y excretado por los riñones. El metabolismo hepático abarca aproximadamente las 2/3 partes de todos los caminos metabólicos y un 10 % es excretado por bilis y heces.

Estudios recientes han señalado la importancia del metabolito de progesterona 20 alfa dihidroprogesterona. Se sugiere que la actividad biológica del mismo sería de la mitad a la cuarta parte de la progesterona (30); esta reducción a un producto menos activo serviría para disminuir la actividad pregestacional durante la fase luteal del ciclo. En la piel la progesterona es reducida a 5 alfa dihidroprogesterona por la 5 alfa reductasa microsomal (31).

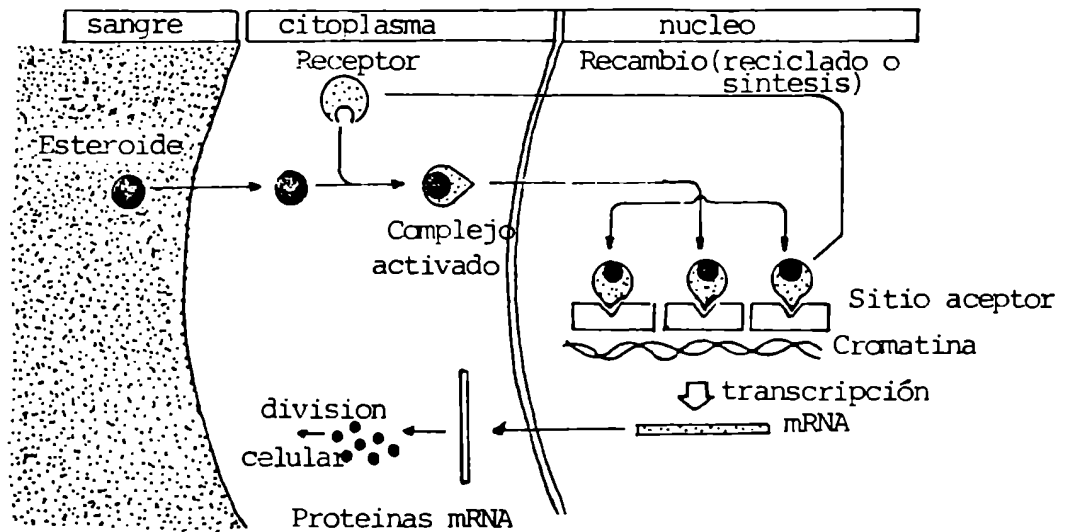
2. Mecanismos de acción

a. Genómicos (Esquema 1)

En general la progesterona como otras hormonas esteroides ejerce su efecto biológico a través de la unión con un receptor específico (32). De acuerdo al modelo clásico, los esteroides entran a la célula por difusión pasiva, se unen a receptores citoplasmáticos protéicos de alta afinidad y luego de un proceso de activación el complejo hormona-receptor es traslocado al núcleo; se une luego a la cromatina induciendo la síntesis de RNA que codifica para las proteínas que están involucradas en la actividad biológica, entre ellas, ovalbúmina, andina y uteroglobina (33). A pesar de que la función de la uteroglobina no está establecida, se ha comprobado que se une a la progesterona manteniendo los niveles altos de la misma en el fluido uterino (34). Actualmente se discute si los receptores citoplasmáticos están en el núcleo y se encuentran en el citoplasma por artificios de técnica. De acuerdo a este nuevo modelo la hormona esteroide entraría directamente al núcleo donde se combinaría con su receptor específico (35, 36) contrariamente a lo descrito para el modelo clásico (37, 38,39).

Los argumentos que más apoyan la teoría de que los esteroides actúan vía síntesis macromolecular son: el hecho de que inhibidores de síntesis de ARN y proteínas también bloquean las respuestas inducidas por esteroides, la demostración de un período de 20 ó 30 minutos hasta varias horas o días entre la entrada de la molécula a la célula y la respuesta biológica (40) y por último el hecho de que la síntesis macromolecular puede continuar por varias horas o días después de la remoción del esteroide (41). Una característica de estos receptores es que exhiben muy alta afinidad por la molécula

DIAGRAMA SIMPLIFICADO DE LA ACCION DE HORMONAS ESTEROIDEAS
MEDIADAS POR RECEPTORES EN UNA TIPICA CELULA BLANCO (18)



ESQUEMA I

que es activa en ese tejido y menor afinidad por moléculas esteroides relacionadas. La progesterona se une con alta afinidad al receptor de progesterona y con baja afinidad al receptor de glucocorticoides (42).

b. No genómicos

El modelo de acción de hormonas esteroideas a través de receptores no es suficiente para explicar todos los fenómenos hormonales. Recientemente algunos autores (43,44) demostraron que la progesterona y otros esteroides son capaces de promover la maduración de ovocitos de Xenopus laevis a pesar de que estas células no contienen receptores para progesterona. Estos autores sugieren que la hormona ejercería su efecto a través de la membrana plasmática, por ejemplo, un aumento de calcio podría activar la síntesis de proteínas utilizando ARN mensajeros preexistentes. Estos efectos no estarían sujetos a inhibidores de la síntesis de RNA, son rápidos y de rápida recuperación luego de la remoción del esteroide. Uno de los efectos directos descriptos para la progesterona es el efecto anestésico (45). Las concentraciones necesarias para la expresión de este efecto están en el orden farmacológico de $5 \times 10^{-5} M$.

3. Actividad antihormonal de la progesterona

La progesterona además de unirse a su receptor específico debido a la estereoespecificidad puede interferir con los sitios de unión de distintas proteínas con actividad hormonal (enzimas y receptores).

a. Actividad antiestrogénica de la progesterona

En el endometrio y probablemente también en las células de la glándula mamaria la actividad antiestrogénica de la pro-

gesterona está mediada por dos mecanismos: 1) la progesterona antagoniza la capacidad de las células uterinas de responder a estradiol decreciendo la cantidad de receptores citoplasmáticos de estradiol (46) y 2) la progesterona induce la 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa involucrada en la conversión de estradiol a estrona (47,48) por lo menos en humanos, aparentemente no en ratas (49).

En el endometrio esta enzima está localizada en el epitelio glandular influenciando la regulación de su actividad a la acción biológica del estradiol. Por ejemplo, las mitosis son inhibidas en el epitelio glandular y no en el estroma durante la fase luteal. In vitro también se ha demostrado que la progesterona tiene una actividad antagonista de la división celular inducida por estrógenos (50) que induce la diferenciación celular (51). En glándula mamaria, se ha observado que grandes dosis de estrógenos inducen en ratones hembras ovariectomizadas la proliferación del sistema tubular, dilatación de los conductos, formación de quistes y aparición de fibrosis del tejido conjuntivo. Cuando se administra progesterona en combinación con estradiol, la glándula mamaria se desarrolla normalmente (52,53). Un antagonismo entre estradiol y progesterona también se encuentra en cerebro. Los estrógenos parecen favorecer la epilepsia mientras que la progesterona ha demostrado tener un efecto antiepiléptico (54). En cobayos, la administración continuada de estrógenos conduce a una reacción fibromatogénica que es contrarestanda con la administración de progesterona (1,2).

b. Actividad antiandrogénica de la progesterona

La testosterona, para poder unirse a su receptor específico en las células target, debe reducirse primero a dihidro-

testosterona mediante la enzima 5 alfa reductasa (55). Se ha demostrado que esta reducción enzimática es competitivamente inhibida por progesterona (56). También se ha descripto que la progesterona y la dihidroprogesterona inhiben la unión de la dihidrotestosterona con su receptor específico en próstata de rata (57). Ambas hormonas pueden inhibir además la reducción de dihidrotestosterona en 3 alfa y 3 beta androstanediones en muestras de piel de mujeres (58). La demostración del efecto inhibidor de la progesterona en dos niveles importantes de la secuencia de acción androgénica da apoyo bioquímico a la eficiencia de la progesterona como antiandrógeno natural.

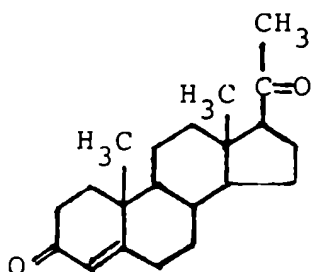
c. Actividad antialdosterona de la progesterona

La capacidad de la progesterona de aumentar la excreción de sodio sólo en presencia de mineralocorticoides activos ha sugerido un antagonismo a nivel tubular (59). Se han obtenido evidencias bioquímicas que la progesterona podría inhibir la unión de la aldosterona a los receptores de mineralo y glucocorticoides, o sea que la progesterona induciría natriuresis a través de la inhibición de la unión de la aldosterona con los receptores de mineralocorticoides (60).

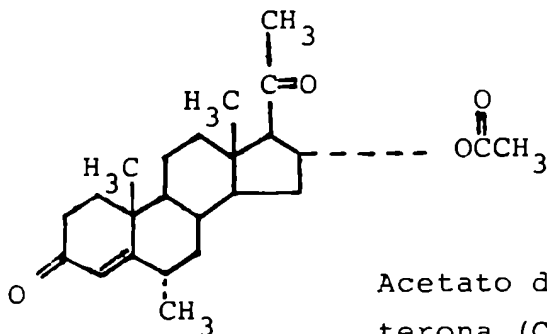
4. Progestágenos sintéticos

Desde 1950 se hicieron muchos esfuerzos para obtener agentes progestacionales con actividad prolongada y con mayor efectividad oral que la progesterona. La mayoría de estos compuestos sintéticos son derivados de 17 alfa acetoxiprogesterona (derivados pregnanos) y de 19 nor testosterona (derivados estranos). La mayoría no son específicos para receptores de progesterona solamente y son capaces de unirse a receptores de estrógenos, andrógenos, o glucocorticoides. Los derivados

pregnanos, entre los que se encuentra el acetato de medroxi-progesterona (MPA), tienen alta afinidad por los receptores de progesterona pero poca afinidad por las proteínas plasmáticas transportadoras como la transcortina. No manifiestan actividad estrogénica o androgénica y tienen baja actividad gonadotrópica; son rápidamente metabolizados. Los derivados estranos tienen una vida media mayor que los pregnanos, tienen alta actividad estrogénica y un efecto antigonadotrópico mayor que los pregnanos (61).



Progesterona ($C_{21}H_{30}O_2$)



Acetato de medroxiprogesterona ($C_{24}H_{34}O_4$)

II. TUMORES

En la actualidad se conocen numerosos factores etiologicamente asociados a la formación de tumores. Estos factores pueden ser intrínsecos o extrínsecos con respecto al individuo; entre los primeros merecen considerarse la herencia, la edad, el estado hormonal, la competencia inmunológica y entre los últimos los carcinógenos físicos, químicos y virales. Se debe mencionar, además, la importancia epidemiológica de ciertas variables geográficas que vinculan de un modo difícil de precisar algunos de los factores antedichos (62).

Para el propósito de esta tesis se va a tratar en especial la relación entre tumores y hormonas y la tumorigenesis inducida por agentes físicos o inducida por un cuerpo extraño.

1. Tumores hormonodependientes

En la última década muchos tumores (endometrio, mama, próstata, leucemia, carcinoma renal, melanoma) han sido considerados hormonorelacionados y en algunos casos hormonorespondedores (63).

El concepto de hormonodependencia derivó de modelos experimentales de tumores inducidos por la administración prolongada de hormonas (64, 65, 66). La falta de inducción tumoral por la hormona antagonista, la evidencia de regresión tumoral después de la manipulación endócrina y la existencia de receptores hormonales como marcadores bioquímicos son evidencias para considerar a un tumor como hormonodependiente (67, 68, 69).

Es necesario señalar que la inducción de tumores por hormonas está muy influenciada por los factores genéticos. La administración prolongada de estrógenos produce distintos tipos de tumores según la especie o cepa que se utilice. Después

de la administración continuada de estrógenos en machos y hembras ovariectomizadas de Syrian hamsters se desarrollan carcinomas renales (65) que retrogradan con tratamiento de progesterona y cortisona (70). La influencia sexual en la tumorigénesis renal está también demostrada por el hecho de que los perros machos desarrollan muchos más tumores que las hembras. Ratones de la cepa C57 desarrollan tumores hipofisiarios cuando son tratados con estrógenos mientras que los ratones de las cepas A y JK desarrollan tumores intersticiales de testículos después del mismo tratamiento. Si se cruzan los animales de la cepa C57 y A o JK, la progenie, cuando es tratada con estrógenos, desarrolla tumores de hipófisis y de testículos de modo que las dos susceptibilidades se transmiten a la descendencia y no son incompatibles (71). En otras cepas de ratones, el tratamiento estrogénico provoca tumores linfoides (72). En ratas tratadas con estrógenos se describieron adenocarcinomas mamarios (73).

Los experimentos que se han realizado con el propósito de producir fibromiomas uterinos, ilustran claramente la necesidad de una susceptibilidad inherente a la especie, raza o individuo, además del estímulo hormonal que los precipita. A pesar de considerarse como enorme el número de ratas, conejos y otros mamíferos de laboratorio tratados con estrógenos, nunca se obtuvieron fibromas uterinos; en cambio en el cobayo se originan tumores fibrosos no sólo del endometrio sino de todos los tejidos dependientes del peritoneo y retroperitoneo, en toda la cavidad abdominal y torácica, los cuales fueron estudiados principalmente por Lipschutz y col. (1,2). Estos autores los atribuyen a una reacción tumoral fibrosa con algunas fibras musculares lisas originadas probablemente de una proliferación del epitelio celómico. La progesterona y otros esteroides con actividad luteoide previenen la formación de estos tumores.

a. Uso de la progesterona y del acetato de medroxiprogesterona (MPA) en tumores hormonodependientes

El acetato de medroxiprogesterona (17 alfa acetoxi-6 alfa metil 4 pregnene 3, 20 diona) fue sintetizado por primera vez en 1958 (74) y ha sido extensivamente usado desde entonces para el tratamiento del carcinoma endometrial avanzado (75). En los primeros años se utilizaban dosis de MPA de 100 a 200 mg por día. Como los resultados que se obtenían no eran muy buenos, el uso de progestágenos fue abandonado casi por completo. Sin embargo, en los últimos años se probaron dosis más altas (500-1500 mg por día) obteniéndose en algunos casos resultados satisfactorios (76-77). El mecanismo de acción del MPA no está completamente elucidado pero podría actuar a través de una interacción con los receptores de progesterona específicos e inhibiendo el crecimiento de las células cancerosas a través de una acción directa sobre el tejido tumoral.

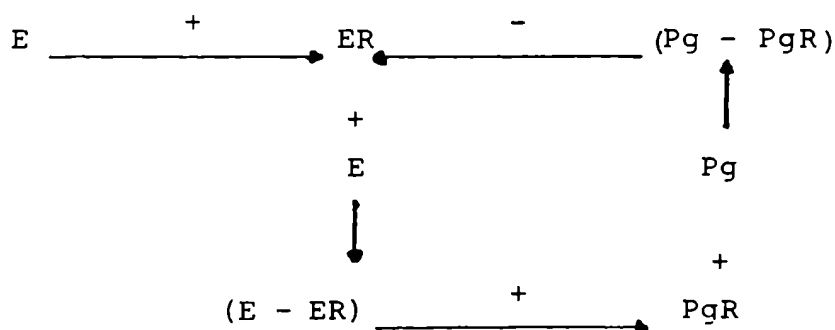
b. Distintas hipótesis que explican la actividad antitumoral del MPA (78)

Estas incluyen:

- i. efecto directo sobre las células tumorales
- ii. efecto androgénico directo
- iii. actividad glucocorticoide directa o mediada por un producto metabólico del MPA
- iv. efecto antigonadotrópico

i. Efecto directo sobre las células tumorales: Debido a los múltiples efectos endocrinológicos del MPA la mayoría de los autores se han inclinado a investigar los efectos directos sobre las células de cáncer de mama. Una gran herramienta para este tipo de estudio es la línea celular MCF-7 derivada de una efusión pleural de cáncer de mama con cariotipo humano en la

cual se encontraron receptores para estrógenos, progestágenos, andrógenos, glucocorticoides, hormona tiroidea e insulina (79, 80). Concentraciones fisiológicas de estrógenos (10^{-9}M) aumentan la incorporación de timidina al DNA (80), la actividad de la timidina quinasa (81) y el crecimiento celular. Este, expresado como síntesis de DNA, es completamente inhibido por concentraciones de 10^{-8}M de MPA pero si se administra estradiol se vuelve a los valores controles (78). Los autores descartan que se trate de un efecto inhibitorio inespecífico debido a la mayor sensibilidad de las células MCF-7 en comparación con las KB o por el antagonismo entre estradiol y MPA. Un efecto antagónico del crecimiento celular ha sido también observado por Leung (82). De acuerdo con este autor, la progesterona estaría involucrada en la regulación negativa de los niveles de receptores de estrógenos (ER). Por otra parte, los receptores de progesterona (PgR) estarían bajo control de estrógenos quienes modularían los niveles de receptores de PgR en células MCF-7 (83); o sea que la acción antagonista de los progestágenos con respecto a la acción estrogénica sería de naturaleza no competitiva interfiriendo en la reutilización de la molécula ER que resulta en una disminución de concentración en el tejido "target" o blanco.



Las células CG5, una variante de la línea celular MCF-7, son altamente sensibles al efecto proliferativo de los estrógenos (84). Concentraciones de 10^{-10} - 10^{-8} M de MPA producen una inhibición del 40 % (dosis dependiente) pero este grado de inhibición no se aumenta aunque las concentraciones de AMP se aumenten hasta 10^{-6} M. Cuando se añade estradiol 10^{-9} M al medio de cultivo con distintas concentraciones de MPA, no hay inhibición por eso se considera que el MPA debería ser más activo en pacientes post-menopáusicas con bajo nivel de estrógenos circulantes. Cuando las células son pretratadas 3 días antes con estradiol, la inhibición con MPA es mayor probablemente porque el estradiol estimula la síntesis de PgR (85). Es importante señalar que el efecto sobre la síntesis de DNA se presenta en menor concentración con el esteroide sintético que con la progesterona misma, lo que podría estar dado por una mayor afinidad del MPA, por el PR o una capacidad diferente de ser traslocada al núcleo (78).

Otras evidencias que demuestran que probablemente sea un efecto directo sobre las células son: la gran correlación que existe entre los pacientes con estudio de receptores de estrógenos y progesterona positivos y el éxito del tratamiento con hormonas. El hecho de que un tumor sea receptor positivo no significa que esté funcionalmente activo, así se explica porque el 30 % de los tumores con estudios de ER y PgR positivos no responden al tratamiento (86). Si bien se ha visto que carcinomas bien diferenciados dan mejor respuesta que los indiferenciados (87), no hay una correlación estricta entre la histología y la capacidad de responder a las hormonas.

ii. Efecto androgénico directo: Se ha postulado que el MPA podría tener actividad androgénica por competición con los receptores andrógenicos. También se ha demostrado que los andrógenos tienen cierta actividad en cáncer de mama humano. Pero

Lippman y col. (79) comprobaron que in vitro las células MCF-7 pueden ser estimuladas con concentraciones fisiológicas y farmacológicas de 5 alfa dihidrotestosterona, por lo tanto difícilmente el MPA inhiba el crecimiento de las células tumorales por este mecanismo.

iii. Actividad glucocorticoide directa o mediada por un producto metabólico del MPA : Está descrito que la progesterona se une a los receptores de glucocorticoides de células de carcinoma mamario (42) y también es sabido que éstos son capaces de inhibir el crecimiento de diferentes líneas celulares con receptores (88) y como ya se mencionó anteriormente las células MCF-7 poseen receptores para glucocorticoides. Si bien el MPA podría inhibir el crecimiento de células MCF-7 mediante este mecanismo, estos autores (78) no apoyan esta hipótesis debido a la mayor actividad in vitro del MPA con respecto a la dexametasona; mientras ésta inhibe el crecimiento en concentraciones de $10^{-7}M$ el MPA lo inhibe a $10^{-8}M$. A nivel de organismo existe evidencia de transformación metabólica de MPA. De hecho se ha aislado el producto metabólico, 6 beta 17 alfa 21 trihidroxi 6 alfa metil 4 pregnene 320 diona, de pacientes tratados con dosis altas de MPA (89) y el significado biológico de este producto no se conoce.

iv. Efecto antigonadotrópico: Este efecto podría contribuir en el caso de tumores hormonodependientes (88), pero no sería el único ya que el mismo se logra con dosis más bajas de MPA que no son suficientes para ejercer un efecto antitumoral.(78)

2. Tumorigenesis por cuerpo extraño

La mera implantación de un cuerpo extraño, como una película de plástico, lleva al desarrollo de tumores en ratones

por un fenómeno conocido como tumorigénesis por cuerpo extraño. Si la implantación es subcutánea los tumores que se originan son sarcomas (91,29), si la implantación es intraperitoneal se forman plasmacitomas (93).

Resultados de numerosos experimentos indican que la incidencia tumoral está fuertemente influenciada por el tipo y curso de reacción a cuerpo extraño. La forma, tamaño o propiedad de la superficie serían de mayor relevancia que la naturaleza química del mismo (91). Así como las cepas de ratones endocriados difieren en su susceptibilidad a la inducción de tumores por diversos cancerígenos (94) esto también ocurre con el proceso de tumorigénesis por cuerpo extraño; entre las cepas susceptibles se encuentran por ejemplo la BALB/c, CBA/H, LP/J y entre las de baja susceptibilidad, L29 y SJL, para los sarcomas (95), y de alta susceptibilidad para plasmacitomas, la cepa BALB/c y NZB (93,96).

En general, a pesar de la heterogeneidad de los tipos de sarcomas obtenidos, estos se caracterizan por ser: a) PAS⁺, argirófilos y con sustancia filamentosa parecida a la lamina basal, b) productores de colágeno focal y c) con prominentes acumulaciones citoplasmáticas de microfilamentos en el 60-100% de las células (97). Se cree que no hay ninguna acción del sistema inmune en la inducción de estos tumores debido a su falta de antigenicidad (98). Se hicieron muchos intentos para determinar el origen y la identidad de las células preneoplásicas. Si bien las células más conspicuas en la reacción de cuerpo extraño son monocitos, macrófagos y fibroblastos, estas no son consideradas las células progenitoras; estudios ultraestructurales de las células tumorales sugieren que cumplirían ese rol células pluripotenciales mesenquimales que poseen características morfológicas consistentes con células de la microvasculatura. La célula endotelial, la célula muscular

lisa y el pericito fueron también considerados como probables células parentales (99).

Parecería que el proceso de tumorigenesis por cuerpo extraño dependería de una serie de eventos donde cada etapa podría proveer condiciones específicas para la maduración preneoplásica. Varios factores estarían etiológicamente involucrados y toda la secuencia sería importante para el desarrollo tumoral (100, 101).

a. Etapas de la reacción a cuerpo extraño

Primera etapa: Iniciación de la reacción inducida por el cuerpo extraño resultando en la activación de células con determinación neoplásica

Durante la implantación del cuerpo extraño y durante las primeras semanas, monocitos y células tipo macrófagos, polimorfonucleares así como ocasionales fibroblastos infiltran el medio ambiente del cuerpo extraño. Luego hay crecimiento capilar igual que en la cicatrización. Del doceavo día en adelante la superficie del cuerpo extraño está totalmente cubierta por macrófagos. Durante este primer mes ya ha sido posible demostrar la existencia de células preneoplásicas en el tejido de reacción pero no en firme contacto con el implante (100). Una posibilidad es que las células preneoplásicas habrían adquirido su determinación preneoplásica en un sitio distante al cuerpo extraño. La dinámica de la reacción sería lo que estimularía la división, la proliferación y la actividad funcional. Esta probabilidad aumentaría durante la proliferación celular forzada por un error en el sistema de regulación de la célula especialmente cuando se divide (101). No se sabe bien porque son las células de la microvasculatura las que adquieren el potencial neoplásico y no otro tipo celular como macrófagos

o fibroblastos; podría deberse a una predisposición intrínseca o al hecho de que estas son células parentales proliferativas mesenquimáticas con un ciclo celular muy largo.

Segunda etapa: Fase de maduración preneoplásica dependiendo de la fibrosis producida por el cuerpo extraño

Durante el segundo mes post-implantación se va formando una cápsula de tejido conectivo fibroso alrededor del cuerpo extraño (102). En esta etapa todavía no se ha demostrado la existencia de células preneoplásicas sobre el cuerpo extraño, sí en la cápsula fibrosa. Se ha demostrado que las propiedades de la superficie del cuerpo extraño influyen el grado de fibrosis así como la incidencia tumoral y la latencia (103,104). Las especies animales difieren en su susceptibilidad a desarrollar este tipo de tumores lo que parece estar relacionado con el grado de fibrosis (101). Mientras en ratas y ratones la reacción se hace fibrótica en 4-8 meses, en el hombre lleva dos años y en el cobayo varios meses. A medida que los fibroblastos van segregando colágeno se comprimen los capilares que luego se obliteran, de esta forma segmentos vasculares o pericitos podrían quedar desconectados, y al estar sin control intercelular se dividirían y diseminan (101).

Tercera etapa: Maduración preneoplásica dependiendo de quiescencia crónica de la reacción inducida por el cuerpo extraño

El comienzo de esta etapa es la demostración de la existencia de células preneoplásicas transfereibles, en la monocapa fuertemente adherida al cuerpo extraño (100). El tiempo de este evento es variable.

Histológicamente, se describe como una reacción quiescente, sin embargo hay proliferación de células adheridas al cuerpo extraño (102). De algún modo, el factor que lleva a la quiescencia

haría madurar a las células preneoplásicas.

Cuarta etapa: Fase de maduración preneoplásica dependiendo del contacto directo de células con la superficie del cuerpo extraño.

La etapa 3 termina y la etapa 4 comienza cuando el contacto con el cuerpo extraño es un prerequisite para que las células preneoplásicas maduren. O sea que en esta etapa existe una fuerte adherencia de estas células con el cuerpo extraño (103, 100).

Quinta etapa: Autonomía y neoplasia:

Esta etapa comienza cuando la célula neoplásica adquiere autonomía. Las células se despegan e invaden el tejido de la cápsula.

b. Factores hormonales que influyen en la tumorigénesis inducida por un cuerpo extraño

Plasmacitomas: Se han registrado diferencias de respuesta en machos y hembras. En un experimento se desarrollaron plasmacitomas en el 57 % de los machos y en el 26 % de las hembras; cuando los ratones fueron gonadectomizados, se obtuvieron tumores sólo en un 29 % de los machos y en un 61 % de las hembras. En hembras tratadas con testosterona, se observó un gran aumento de la incidencia de estos tumores comparado con los controles.

Progesterona (0,01 mg/día) y estradiol (0,1 mg/día) inhibieron la inducción de plasmacitomas (105).

Sarcomas: En este caso también se ha demostrado una diferente susceptibilidad según el sexo en una misma cepa. En general, en casi todas las cepas estudiadas, las hembras tienen mayor

incidencia tumoral que los machos; una excepción es la cepa AKR (95). Michelich y Brand (106) demostraron que la ovariectomía no afecta la incidencia de sarcomas en hembras pero si prolonga la latencia. Los autores sugieren que los estrógenos tendrían un efecto promotor en la formación de estos tumores ya que es conocido que esta hormona tiene un efecto promotor en los órganos "target" y que las células mesenquimales de la microvasculatura tendrían receptores para estrógenos (107).

DESARROLLO DE LAS FIBROSIS

La formación de tejido fibroso es el proceso usual de reparación después de casi todo tipo de daño. En el caso más simple de curación de una herida la fibrosis restaura los tejidos dañados y a pesar de que muchas veces la estructura original del tejido no se recupera, el producto final es adecuado tanto funcional como estructuralmente. Sin embargo, hay circunstancias en las cuales hay acumulación anormal de tejido fibroso en forma de escaras hipertróficas o queloides y adhesiones peritendinosas e intraabdominales. En otras situaciones como cirrosis hepática y fibrosis pulmonar la acumulación de tejido fibrótico interfiere seriamente con la función del tejido dañado (198).

El tejido fibroso es el producto final de la respuesta inflamatoria, una respuesta que conduce a la invasión de fibroblastos en proliferación en la región dañada. En las primeras horas subsiguientes a la formación de una herida se encuentran proteínas séricas, fibrina y agregados plaquetarios. Las plaquetas segregan un factor que provoca la proliferación de fibroblastos; luego aparecen neutrófilos que son reemplazados por monocitos que son el tipo celular predominante después de las 72 horas. El monocito es el precursor del macrófago. El precursor del fibroblasto, al menos en heridas y granulomas no es ni el monocito ni los fibrocitos adyacentes involucrados, sino las células indiferenciadas mesenquimáticas originadas en el tejido vascular que migran al área dañada. Cuando se diferencian en fibroblastos, se dividen y desarrollan un aparato secretor, múltiples nucleolos, retículo endoplasmático y aparato secretor de Golgi. Las mitosis celulares continúan hasta que las células están en contacto. Cuando cesan las mitosis y cesa la migración comienza la síntesis de los componentes

del tejido fibrótico (108).

Todas las moléculas de colágeno consisten en tres cadenas polipéptidicas que forman un tipo de hélice. Se caracterizan por la presencia de residuos hidroxiprolina e hidroxilisina; algunos de los residuos hidroxilisina tienen residuos glicosil unidos a través del grupo oxhidrilo. Las moléculas de colágeno se pueden agregar en fibrillas; estos agregados están unidos por enlaces covalentes. Se han aislado 5 tipos diferentes de cadenas alfa que dan origen a 4 tipos de colágeno diferentes. Existe algún grado de especificidad en el tipo de colágeno encontrado en los distintos tejidos. El colágeno de la fibrosis parece ser tipo 1, igual que en hueso, dermis, tendón, córnea y dentina, y tipo 3, igual que en dermis fetal e infantil y del sistema cardiovascular (109, 110).

Se ha postulado que sobrenadantes de monocitos estimulados por sílica aumentan la síntesis de colágeno por fibroblastos y estimulan la proliferación de los mismos (111,112), sin embargo los estudios in vitro son un poco contradictorios ya que otros autores (113) han observado inhibición de la síntesis de colágeno por sobrenadantes de monocitos estimulados con antígenos. Todavía se necesitan más estudios para establecer la validez de los ensayos con factores fibrogénicos. En muchas fibrosis no está claro si la síntesis de colágeno está aumentada o si está inhibida su degradación como por ejemplo en la esclerodermia.

El colágeno nativo es extremadamente resistente a la degradación proteolítica a pH fisiológico. La síntesis de colágeno en animales adultos es muy lenta; por ejemplo, en rata se ha demostrado que la vida media es de un año (114). Bajo ciertas condiciones fisiológicas, las fibras de colágeno pueden ser degradadas por enzimas específicas, colagenasas y proteasas que operan de un modo selectivo y conservativo. La colagenó-

lisis no está bien comprendida. Estudios de la evolución del útero postparto han demostrado que hay una gran dependencia hormonal (115,116). También se ha demostrado que las diferentes formas genéticas de colágeno no exhiben igual susceptibilidad a la acción de la colagenasa.

1. Progesterona y fibrosis

El efecto antifibrótico y anti-adherencia que posee la progesterona se comprobó por un lado con la inhibición de tumores fibrosos inducidos por estrógenos en cobayos (1,2) y por otro lado en estudios que tratan de demostrar el rol de la progesterona en la preñez, el cual según diferentes autores (20,27) sería el de prevenir el ataque inmunológico de la madre hacia un feto semialogeneico. Siiteri y col. (27) implantaron por vía subcutánea en el flanco de ratas, tubos de silastic, con o sin progesterona, envueltos en algodón o piel de hamster. Después de una semana observaron que los tubitos vacíos estaban rodeados de un granuloma y adheridos a la fascia subyacente. Los tubitos con progesterona no generaron ninguna respuesta inflamatoria. El transplante de piel de hamster colocado sobre el tubito con la hormona se mantuvo viable más de 35 días mientras que en los controles no sobrevivió más de 10 días. Los resultados con injertos de piel en animales tratados con progesterona son poco consistentes y dependen de la dosis administrada. Krohn (117) y Hulka (118) no obtuvieron aumento de sobrevida de aloinjertos de piel en conejos tratados con la hormona, ni Medawar y col. (119) trabajando en ratones. Moriyama y Sugawa (120) observaron un aumento de sobrevida de células tumorales xenogeneicas implantadas en úteros de hamsters. Esta sobrevida era dependiente de la continua administración de progesterona (1 mg/día) que

fue efectiva por más de 120 días; las células se rechazaron después de la interrupción del tratamiento. El mecanismo por el cual la progesterona ejerce estos efectos en el útero no se conoce.

Turcotte y col. (121) observaron un aumento de sobrevida del injerto renal en perros tratados con MPA y azatioprina comparando estos resultados con los de perros tratados solamente con azatioprina. Estos resultados, sin embargo, no pudieron ser repetidos por otros autores (Lanari, comunicación personal). En otro sistema experimental, con la inducción de granuloma por carragenina, Atkinson y col. (122) demostraron que la progesterona comparada con otros esteroides no tiene acción antiinflamatoria, con dosis de 2 mg diaria durante 5 días. Sin embargo, Nakagawa y col. (123), en un modelo similar, inyectando aire en un flanco de la rata y luego inyectando carragenina para inducir inflamación, demostraron que la progesterona, en dosis de 1 mg/kg intramuscular cada 12 hs durante 4 días, disminuía el tamaño del granuloma. Se obtuvieron resultados similares cuando el tratamiento de progesterona se inició 7 días después de la inducción de la inflamación, o sea que la progesterona provocó la involución del tejido granulomatoso preexistente. A pesar de todo la progesterona no tuvo efecto en la degradación de colágeno o en la incorporación de prolina al colágeno.

Maurer y Bonaventura (124) han demostrado que cobayas tratadas con progesterona desarrollan menos adherencias luego de cirugía pélvica que cobayas no tratadas; Garegnani y col (125) observaron que en perros inoculados con progesterona se inhibe la formación de adherencias pleurales alrededor de gasas colocadas en el pulmón. Estos autores comprobaron que la progesterona actúa pasadas las etapas iniciales de la inflamación ya que las diferencias con los controles no tratados

eran mínimas en los primeros 10 días y se acentuaban al mes de iniciado el proceso.

In vitro también se hicieron muchos estudios para investigar la acción inmunosupresora de la progesterona. En general, se estudió el efecto de la progesterona sobre la activación de células T por mitógenos (126,127,128), antígenos (128) o células alogeneicas (129,130) y se demostró que se bloquea la activación de células T en concentraciones de 5 ug/ml a 20 ug/ml (119,127-130). Clemens y col. (130) demostraron que la progesterona tendría al menos dos efectos sobre las células T activadas: primero inhibiría la síntesis de DNA cuando la célula está expuesta siempre a la hormona, y segundo interferiría también con la incorporación de Tim-³H posiblemente bloqueando el transporte de sus precursores por la membrana plasmática. En ratones, Pavia y col. (131) también observaron que los esteroides sexuales inhiben la activación de esplenocitos por células alogeneicas pero en concentraciones un poco más bajas que en cultivos de células humanas (5-10 ug/ml). Todavía no se ha determinado si estas concentraciones coinciden con las concentraciones de progesterona placentarias en el ratón; se comprobó, en cambio, que coinciden con las que se detectaron en placenta humana (10 µM) (22). También se demostró que la progesterona en las mismas concentraciones anteriores disminuye la producción de células supresoras generadas en un cultivo mixto (132). Sin embargo, Holdstock y col. (133) detectaron un incremento de generación de células supresoras por progesterona en un sistema de activación con Con-A. En estos experimentos, las concentraciones de progesterona fueron 50 veces menores a las usadas en experimentos anteriores. Algunos autores (134) han medido la capacidad de distintos esteroides de competir con la dexametasona por su receptor en linfocitos periféricos, señalando que la

progesterona tiene un grado de competición bastante razonable como para pensar que la inhibición de la respuesta inmune por progesterona podría estar mediada a través de receptores para glucocorticoides. Sin embargo, Stites y Siiteri (135) creen que aunque el cortisol produce efectos similares en las células linfoides hay bastantes diferencias en el mecanismo de acción, por lo cual sugieren que la progesterona no actuaría en células inmunes a través de la unión a receptores de glucocorticoides, sino más bien se trataría de una acción directa sobre la membrana plasmática (22).

Otros autores consideran que las concentraciones placentarias de esteroides no son lo suficientemente altas para pensar que las hormonas actúen mediante efectos directos sobre los linfocitos (136,137). Por esta razón sugieren que los esteroides podrían afectar a la respuesta inmune indirectamente induciendo en el timo la producción de factores o células inmunoregulatorias (138). En el timo se han detectado células con receptores para estrógenos, andrógenos y corticoesteroides pero no para progesterona; estos autores postulan que son factores tímicos estimulados por estrógenos los que ejercen el efecto inmunosupresor (139).

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

ESTUDIOS IN VIVO

1. Animales

En todos los experimentos se utilizaron ratones adultos y de ambos sexos criados en nuestro bioterio y alimentados con pellets de Cargill y agua ad libitum.

2. Tumores de trasplante

a. Fibrosarcoma (Px)

Este tumor fue inducido por un fenómeno conocido como tumorigenesis por cuerpo extraño; apareció 9 meses después de la implantación subcutánea de un cilindro de vidrio en una hembra BALB/c de 2 meses; se mantiene por pasajes subcutaneos seriados en la cepa de origen. Se usaron los pasajes 56 a 135. El tumor crece in situ y no da origen a metástasis.

b. Leucemia linfoide (LB)

Este tumor apareció espontaneamente en una hembra BALB/c de 6 meses de edad. Se mantiene por pasajes subcutaneos seriados en la cepa de origen y se usaron los pasajes 66-82. Crece in situ hasta alcanzar un gran tamaño y en la autopsia se encuentra infiltración leucémica en nódulos linfáticos, bazo e hígado.

c. Carcinoma epidermoide indiferenciado (CEI)

Este tumor surgió espontaneamente en una hembra BALB/c de 12 meses de edad; se mantiene por pasajes subcutaneos seriados en la cepa de origen y se usaron los pasajes 3-6. Es un tumor de crecimiento lento y ocasionalmente en la autopsia

se encuentran metástasis de pulmón.

3. Administración de Progesterona y MPA

Se empleó la progesterona y el acetato de medroxiprogesterona (MPA) en polvo de la casa Schering y el MPA en suspensión de microcristales en forma de Depo Provera de la casa Upjohn y Farlutale de Farmitalia.

a. Progesterona en esponja

Se preparó una solución de 50 mg de progesterona por ml de alcohol absoluto a 37°C. Se esterilizaron esponjas de nylon de 1 cm³, las cuales se embebieron con 2 ml de la solución de progesterona (se embebía 0,2 ml, luego se dejaba evaporar, luego otros 0,2 ml y así sucesivamente). Para evitar la pérdida de material las esponjas se mantuvieron suspendidas de un hilo hasta que estuvieron bien secas. Luego se introdujeron subcutáneamente en el flanco de hembras BALB/c. Se midió la acción de la progesterona mediante el control de los ciclos estrales, obteniendo estados de metaestro-diestro característicos de pseudopreñez. A los 2 días después de la implantación de las esponjas, se inoculó el tumor mediante trócar en la vecindad de las mismas o en el flanco contralateral. Como control se utilizaron esponjas embebidas solamente en alcohol.

b. Progesterona y MPA dentro de un tubito de silastic

En otros experimentos se implantaron tubitos de silastic llenos con progesterona o MPA y sellados en los extremos con silastic e igual que en el caso anterior se inoculó el tumor mediante trócar en la vecindad o en el flanco contralateral.

c. Acetato de medroxiprogesterona en suspensión de microcristales

Los tumores fueron inoculados en forma de fragmento sólido mediante trócar o como suspensión celular de 10^5 en Minimal Essential Medium (MEM) junto con 50 mg de acetato de medroxiprogesterona (MPA) (Depo Provera 150 o Farlutale 500). Los controles recibieron igual volumen de solución fisiológica o del excipiente en que está vehiculizado el MPA. Este último consiste en 28,8 mg/ml de polietilenglicol 4000; 1,92 mg/ml de polisorbato 80; 8,65 mg/ml de cloruro de sodio; 1,73 mg/ml de metilparabeno y agua destilada hasta completar 1 ml.

En otros experimentos las células tumorales fueron inoculadas primero y luego el MPA o el excipiente fueron inoculados en el día 3 o 7 después del inóculo tumoral.

4. Tumorigénesis por cuerpo extraño

El modelo del cilindro de vidrio diseñado en este laboratorio (149) consiste en la implantación subcutánea de un tubo de vidrio, abierto en ambos extremos de 2 cm de longitud y 0,7 cm de diámetro. Un total de 118 animales portadores de cilindro de vidrio fueron subdivididos en tres grupos: 1) 38 ratones (13 hembras y 26 machos) recibieron 40 mg de MPA (Farlutale 500 Farmitalia) dentro del cilindro de vidrio una semana después de su implantación. Esta administración se repitió en la vecindad del cilindro de vidrio bimestralmente durante un año. 2) 41 ratones (7 hembras y 34 machos) fueron similarmente tratados con MPA por vía subcutánea (s.c.) pero en el flanco contralateral al cilindro de vidrio. 3) 39 ratones (9 hembras y 30 machos) fueron usados como controles.

Los animales fueron controlados semanalmente; cuando se detectaba la presencia de un tumor, el animal era separado y controlado diariamente. Cuando el tamaño del tumor era grande

se lo sacrificaba. Para el estudio histológico, las muestras tumorales eran fijadas en FAM (formaldehído, ácido acético, metanol) procesadas a través de alcohol y xileno, embebidas en parafina y coloreadas con hematoxilina eosina, con la técnica de tricromo de Masson y con la técnica de Gomori para fibras de reticulina. Los adenocarcinomas fueron también coloreados con PAS. El efecto del MPA se controló por la suspensión de los ciclos estrales.

5. Estudios estadísticos

Los tiempos de latencia del tumor se compararon mediante el test t de Student y la incidencia de tumores inducidos por cuerpo extraño, así como el ritmo de aparición de los mismos se estudiaron por el análisis de covariancia.

ESTUDIOS IN VITRO

1. Medios de cultivo

Se utilizó en todos los casos Minimal Essential Medium (MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) de complementado mara Gibco, 1% de glutamina, 0,50 ug/ml de gentamicina y 1% de Anfotericina B.

2. Despegado de células

En todos los casos las células fueron despegadas con Tripsina-versene al 0,2 %.

3. Cultivos celulares

a. Cultivo primario de fibroblastos embrionarios murinos

Homogenatos de embriones decapitados de ratones BALB/c de 13-17 días de gestación fueron cultivados en frascos Falcón 3042. Luego de 5-7 días de cultivo las monocapas celulares fueron despegadas con tripsina versene. Después del desprendimiento celular se inactivó la tripsina con suero fetal bovino (SFB). Estas células de primer repique fueron las que se utilizaron en todos los ensayos.

b. Cultivo primario de fibroblastos de fibrosarcoma murino

Se utilizó el mismo fibrosarcoma (Px) que para los experimentos in vivo. Después del séptimo día de pasaje seriado singeneico, cuando el tumor todavía tenía un tamaño menor a 1 cm³, se lo extrajo esterilmente y se cultivó por el método del explanto. Luego de aproximadamente 14 días de incubación en estufa gaseada se tripsinaron las células y este primer repique fue utilizado en los ensayos. Cuando se inoculó una suspensión celular de 100.000 células en un ratón BALB/c el tumor creció.

c. Línea celular HELA

Esta línea se originó a partir de un carcinoma de útero de una paciente. Fue gentilmente cedida por la Dra Allonio del Instituto Malbrán.

d. Línea celular WISH

Esta es una línea de estirpe epitelial diploide que se estableció a partir de amnios humano y fue gentilmente cedida por el Dr. Díaz del laboratorio Sidus.

4. Prueba de viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular se utilizó la siguiente solución: azul tripán: 0.14 %, cloruro de sodio: 4,25%, que se mezclaron en una proporción de 4 a 1 antes de usar. Se diluyeron las muestras en estudio 1:2 con esta solución y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se contaron las células en cámaras cuentaglóbulos (Cámaras de Neubauer). Las células viables excluyen el colorante, mientras que las no viables lo incorporan y aparecen azuladas al microscopio óptico.

5. Soluciones de esteroides

Se prepararon soluciones madre de progesterona, $5 \times 10^{-2} M$ en etanol 100°, MPA $1,9 \times 10^{-2} M$ en dimetilsulfóxido-etanol (1:1), dexametasona $1,6 \times 10^{-2} M$ en etanol 100° y cortisol $1,5 \times 10^{-2} M$ en etanol 100°. Para lograr las concentraciones finales de esteroides se hicieron diluciones de las soluciones madre en medio de cultivo. La concentración final de etanol no superó el 1%. A las concentraciones de hormona utilizadas no se observaron microcristales, los que sí aparecieron en concentra-

ciones superiores a $2 \times 10^{-4} \text{M}$ para progesterona y $7 \times 10^{-5} \text{M}$ para MPA.

6. Medición de crecimiento celular mediante la técnica de incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-Tim}$) (24 hrs). Esquema 2.

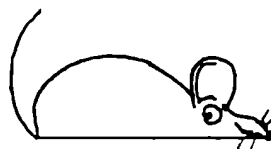
En cada hoyo de una microplaca de cultivo de fondo plano (Falcon 3042) se sembraron suspensiones celulares de 5×10^4 células/ml. Se incubaron durante 24 horas, (48 hs en caso de fibroblastos tumorales (FT)) en estufa gaseada con 5 % de CO_2 a 37°C para lograr la adherencia de las células. Luego se reemplazó el medio por MEM-SFB con las distintas concentraciones de esteroide. Como control se utilizó MEM-SFB con diluyente de esteroide (etanol 1%). En todos los hoyos se agregó un pulso de 1 μCi de $^3\text{H-Tim}$ (actividad específica 20 Ci/mM, New England Nuclear USA). Cada dilución de esteroide se hizo por lo menos por sextuplicado. Luego de 24 horas de incubación se tripsinó cada hoyo para despegar las células y se inactivó la tripsina con 100 μl de MEM-SFB. Los cultivos se recogieron en papel Whatman GF/A por medio de un cosechador de células, luego se colocaron en viales con líquido de centelleo y la radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Packard 3002. Los controles con MEM-SFB se consideraron como 100% de incorporación.

En otros experimentos se incubaron los fibroblastos embrionarios durante 72 horas en progesterona agregando la $^3\text{H-Tim}$ en las últimas 24 hs del cultivo. En un experimento los fibroblastos embrionarios con la progesterona se incubaron durante 48 horas, luego se cambió el medio por medio sin progesterona y se agregó la $^3\text{H-Tim}$ para ver si el efecto era reversible.

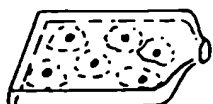
INHIBICION DE CRECIMIENTO



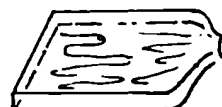
Fibrosarcoma
10 días



Embriones
15 días



Cultivo
10 días



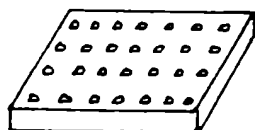
Cultivo
6 días



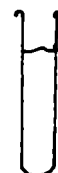
Tripsina

$5 \cdot 10^4$ cel/ml

0.2 ml/hoyo



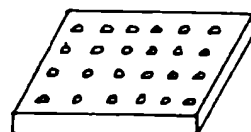
Incubación 48 hs. 37°C 5% CO_2



Tripsina

$5 \cdot 10^4$ cel/ml

0.2 ml/hoyo



Incubación 24 hs. 37°C 5% CO_2

0.2 ml de PROGESTERONA ($1.4-0.04 \cdot 10^{-4}\text{M}$)
en MEM-SFB + 0.2 μCi de $^3\text{H-Ti}$ (sextuplicado)
incubación 24 ó 72 hs. 37°C 5% CO_2

Se tripsina cada hovo

Se cosecha

ESQUEMA 2

7. Medición del efecto citotóxico (Esquema 3)

Para medir el efecto citotóxico se marcaron las células con cromato de sodio radioactivo y se midió la liberación de ^{51}Cr al sobrenadante, procediendo de la siguiente forma: En cada hoyo de una microplaca de fondo plano (Falcon 3042) se sembraron 0,2 ml de suspensiones celulares de 5×10^4 células/ml a las que previamente se había agregado 10 μCi de ^{51}Cr (CONEA, Buenos Aires o New England Nuclear, Boston, Mass. USA). Luego de 24 horas de adherencia (48 horas para FT) se hicieron 3 lavados exhaustivos con solución de Hanks para eliminar la marca no incorporada a las células. Luego se colocó MEM-SFB con las distintas concentraciones de progesterona ($0,7 \times 10^{-4}\text{M}$ a $2 \times 10^{-4}\text{M}$). Como control se utilizó MEM-SFB con etanol al 1 % y como control del máximo de liberación posible se utilizó Tritón 5 % en MEM-SFB. Luego de 3 horas de incubación a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO_2 en aire se extrajo 0,1 ml de sobrenadante y la radioactividad de las muestras se determinó en un contador gama (Packard 3320, automático). La capacidad lítica de la progesterona se visualizó por la ruptura de las células en cultivo y la consiguiente liberación al sobrenadante del ^{51}Cr con que estaban marcados. Para cuantificar el efecto citotóxico se utilizó la siguiente fórmula:

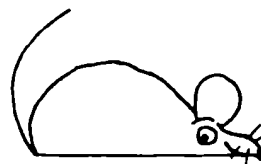
$$\% \text{ citotoxicidad} = \frac{\text{CPM experimental} - \text{CPM espontánea}}{\text{CPM Tritón} - \text{CPM espontánea}}$$

CPM espontánea es la liberación de Cr del grupo control sin progesterona.

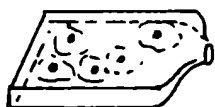
Para corroborar si el lavado fue efectivo se utilizó un grupo sacando 0,1 ml de sobrenadante a tiempo 0. Los ensayos se hicieron por sextuplicado.

EFEECTO CITOTOXICO

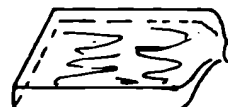
Fibrosarcoma
10 días



Embriones
15 días
o células
WISH o HELA



Cultivo
10 días



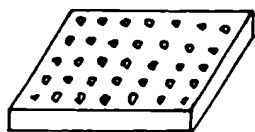
Cultivo
6 días



Tripsina
 $5 \cdot 10^4$ cel/ml
+
 $10 \mu\text{Ci}$ de $^{51}\text{Cr}/\text{ml}$

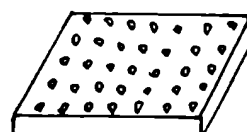


Tripsina
 $5 \cdot 10^4$ cel/ml
+
 $10 \mu\text{Ci}$ de $^{51}\text{Cr}/\text{ml}$



0.2 ml/hoyo

Incubación 48 hs. 37°C 5% CO_2



0.2 ml/hoyo

Incubación 24 hs. 37°C 5% CO_2

3 lavados con solución Hanks
0.2 ml de PROGESTERONA ($2.4-0.7 \cdot 10^{-4}\text{M}$)
en MEM-SFB (sextuplicado)
Incubación 3 hs 37°C 5% CO_2
Contar $100 \mu\text{l}$ del sobrenadante

E S Q U E M A 3

8. Estudios de microscopía óptica

Con el objeto de estudiar el efecto de la progesterona sobre los cultivos celulares se sembraron 25×10^4 células sobre un cubre en tubos de Leighton los que se incubaron en estufa con atmósfera de CO_2 a 37°C durante 24 horas para permitir la adherencia de las células; luego se cambió el medio de cultivo y se lo reemplazó por medio de cultivo con progesterona (1 y $1,4 \times 10^{-4}\text{M}$) y se incubaron los cultivos durante 24 ó 48 horas. Como control se utilizó medio con diluyente solamente. Al finalizar la incubación, las células adheridas al cubreobjetos fueron fijadas en FAM, coloreadas con hematoxilina eosina y montadas sobre portaobjetos para el estudio microscópico. Se determinó el número de mitosis por campo.

R E S U L T A D O S

ESTUDIOS IN VIVO

I. TUMORES TRANSPLANTADOS

1. Fibrosarcoma (Px)

a- Inoculado mediante trocar:

Cuando se implantaron esponjas de nylon impregnadas con progesterona o tubitos de silastic conteniendo progesterona o acetato de medroxiprogesterona (MPA), y dos días más tarde se inoculó mediante trocar un fragmento de fibrosarcoma (Px), no hubo ninguna diferencia en cuanto al crecimiento tumoral comparado con los controles correspondientes (Tabla 1). El cuerpo extraño, ya sea el silastic o la esponja produjeron un efecto exacerbante del crecimiento de este tumor que no pudo ser contrarrestado por la progesterona. Es probable que este sea el motivo por el que los ratones inoculados con el tumor en el flanco contralateral a la esponja tuvieran una sobrevida prolongada, es decir una mayor latencia de muerte.

Se decidió entonces utilizar el MPA depot (Depo Provera de Upjohn o Farlutale de Farmitalia). Se inocularon 50 mg de MPA junto con el trasplante de fibrosarcoma en ratones BALB/c. En la Tabla 2 y Figura 1 se observan los resultados obtenidos. Mientras que en los controles inoculados con trasplante tumoral y solución fisiológica el tumor creció en todos los animales, en los tratados con AMP sólo creció en un 72 % de los ratones; además la latencia de muerte en los animales en los cuales el tumor creció fue mayor que en los controles. Como no se podía descartar que el efecto observado correspondiera al excipiente en el cual está vehiculizado el MPA, se repitió este experimento añadiendo otro grupo control

TABLA 1

EFEECTO DE LA PROGESTERONA (P) Y DEL ACETATO DE MEDROXI-
PROGESTERONA (MPA) SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN FIBROSAR-
COMA (Px) EN RATONES BALB/c

Progestágeno (P o MPA) Vía de administración	Mortalidad		Latencia de muerte
	tumor/n	%	días ($\bar{X} \pm ES$)
Esponja + P + Px	12/12	100	30 \pm 3
Esponja + Px	11/11	100	30 \pm 2
Tubo silastic + P + Px	12/12	100	25 \pm 3
Tubo silastic + Px	11/11	100	25 \pm 3
Tubo silastic + P + Px*	11/11	100	38 \pm 2
Tubo silastic + Px*	5/5	100	36 \pm 2
Tubo silastic +MPA+ Px	9/9	100	30 \pm 2
Tubo silastic + Px	6/6	100	29 \pm 2

* implante tumoral subcutáneo en el flanco contralateral

TABLA 2

EFFECTO DEL MPA SOBRE UN FIBROSARCOMA (Px) TRANSPLANTADO
POR VIA s.c. EN RATONES BALB/c

	Px + MPA	Px + Sol. Fisiol.
Mortalidad	13/18 (72) *	17/17 (100%)
Latencia (día de muerte)	43 \pm 2**	26 \pm 2 (p < 0,001)

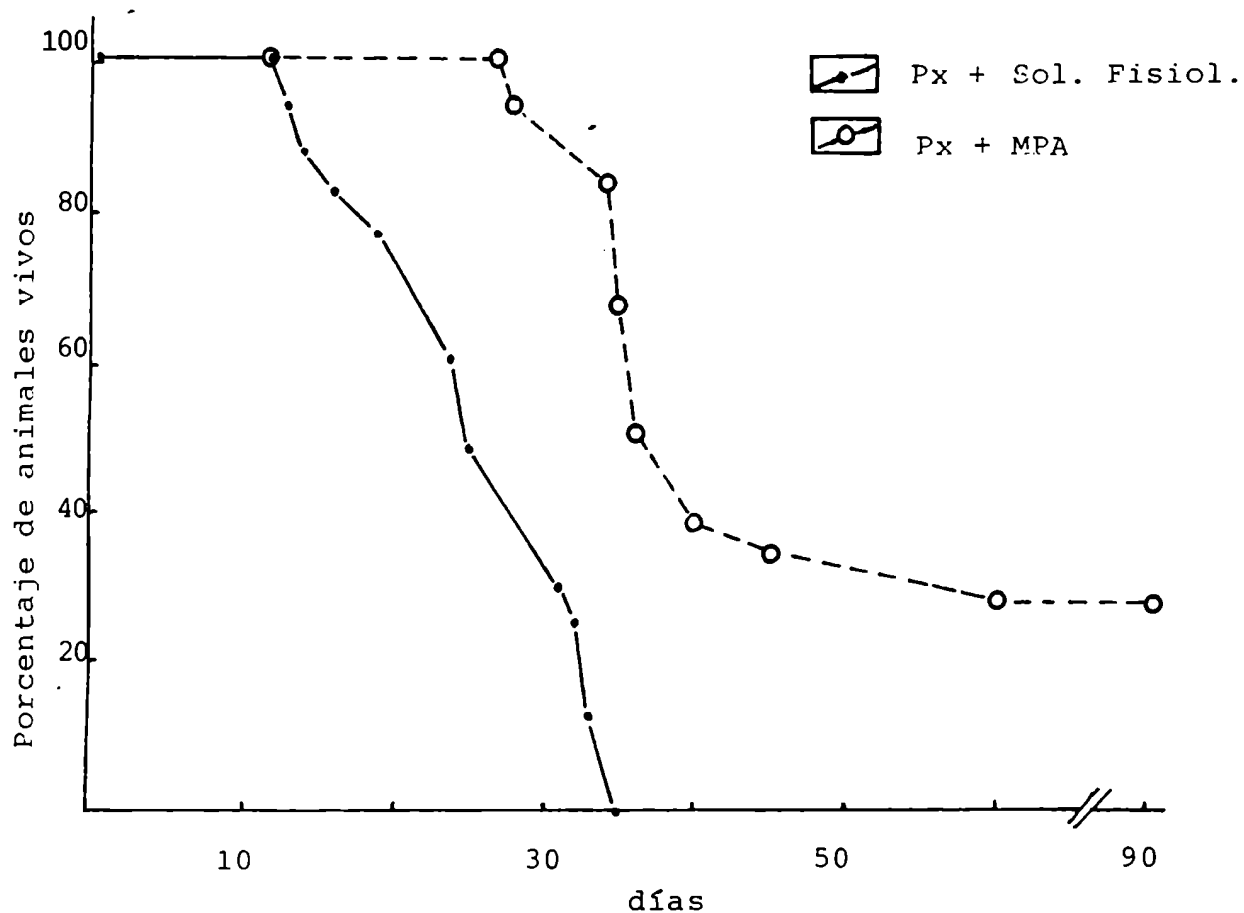
Día	Tamaño tumoral (mm ²)***	
8	80 \pm 11**	76 \pm 9
11	110 \pm 10	300 \pm 36
13	155 \pm 23	421 \pm 33
15	212 \pm 41	529 \pm 46
17	214 \pm 39	565 \pm 43
19	284 \pm 63	687 \pm 39
25	476 \pm 71	763 \pm 48

* : n/total

** : $\bar{x} \pm ES$

*** : Considerando solamente los animales en los cuales
el tumor creció

Figura 1: Curvas de sobrevivencia de ratones BALB/c inoculados con un fibrosarcoma singeneico (Px) junto con 50 mg de acetato de medroxiprogesterona (MPA) o solución fisiológica



tratado con el excipiente. En la Tabla 3 y Figura 2 se observa que el excipiente tuvo un efecto exacerbante sobre el crecimiento del tumor ya que los ratones de este grupo murieron en menos tiempo que los controles inyectados con solución fisiológica; además el tamaño del tumor fue significativamente mayor. Así se comprobó que el MPA y no el excipiente es el responsable del efecto inhibidor observado. Se puede concluir a partir de estos experimentos que el MPA cuando es inoculado junto con un trasplante de fibrosarcoma singeneico inhibe el crecimiento del mismo.

b- Inoculación de una suspensión celular de fibrosarcoma

i. Inóculo tumoral junto con MPA:

Se evaluó si el efecto inhibidor del crecimiento del tumor Px se mantenía cuando se lo inoculaba mediante una suspensión celular; para ello se repitieron los experimentos anteriores administrando 10^5 células en suspensión junto con MPA. En la Tabla 4 se observa que no hubo crecimiento tumoral en el grupo de ratones tratados con MPA, mientras que en los controles inoculados con excipiente y con solución fisiológica, el tumor creció en un 78 y 80 % de los animales respectivamente. En este experimento, en contraste con los experimentos anteriores, no hubo diferencias de crecimiento tumoral entre los controles con excipiente y los controles con solución fisiológica.

ii. Administración de MPA al día 3 del inóculo tumoral

Se evaluó también que efecto tenía el MPA cuando era administrado días después del inóculo tumoral. Como puede verse en la Tabla 5, no hubo diferencia significativa en el crecimiento tumoral y mortalidad entre los grupos tratados con 50 mg de progesterona, excipiente o solución fisiológica 3 días después del inóculo tumoral. En cuanto al tiempo de latencia de

TABLA 3

EFFECTO DEL MPA Y DEL EXCIPIENTE SOBRE UN FIBROSARCOMA (Px)
TRANSPLANTADO POR VIA s.c. EN RATONES BALB/c

	I	II	III
	Px + MPA	Px + Excipiente	Px + Sol. Fisiol.
Mortalidad	4/11 (36%) ^a	10/10 (100%)*	5/5 (100%)
Latencia (día de muerte)	45 ± 6** ^a	29 ± 2	35 ± 4

Día	Tamaño tumoral (mm ²)***		
8	92 ± 34	221 ± 22	62 ± 26
11	248 ± 62	463 ± 63	184 ± 25
13	578 ± 78	578 ± 57	265 ± 37
15	328 ± 105	660 ± 69	304 ± 20
18	491 ± 193	673 ± 53	403 ± 46
20	457 ± 196	826 ± 73	377 ± 24
22	583 ± 218	952 ± 103	495 ± 20
25	643 ± 237	955 ± 107	607 ± 46
27	690 ± 220	923 ± 95	727 ± 79

* : n / total

** : $\bar{x} \pm ES$

*** : Considerando solamente los animales en los cuales el tumor creció

a : $p < 0.01$ entre I y II

Figura 2 : Curvas de sobrevivencia de ratones BALB/c inoculados con un fibrosarcoma singeneico (Px) junto con 50 mg de acetato de medroxiprogesterona (MPA), Excipiente o solución fisiológica

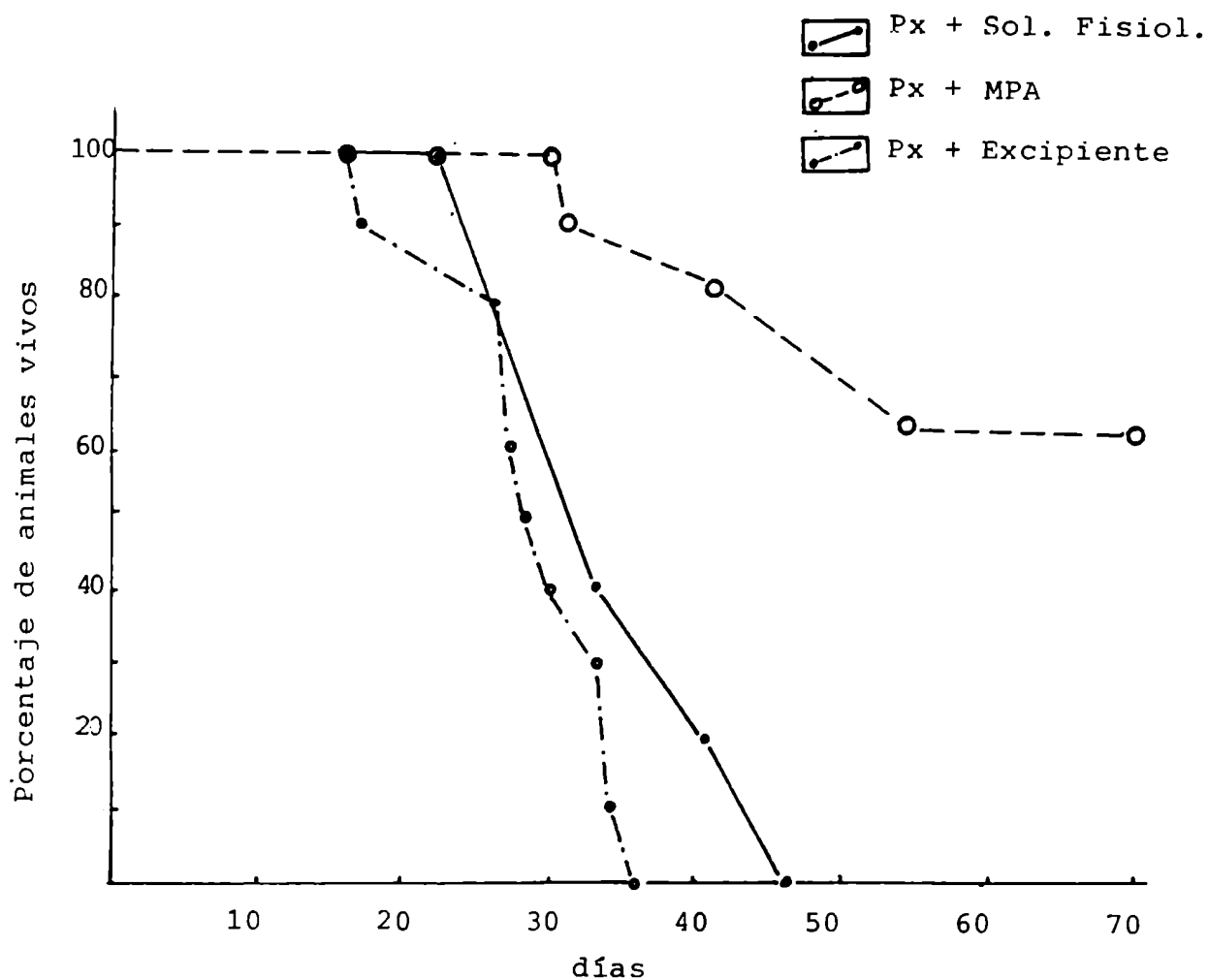


TABLA 4

EFFECTO DEL MPA Y DEL EXCIPIENTE SOBRE UNA SUSPENSION
CELULAR (10^5) DE UN FIBROSARCOMA (Px) INOCULADA POR
VIA s.c. EN RATONES BALB/c

	I	II	III
	Px + MPA	Px + Excipiente	Px + Sol.Fisiol.
	a		
Mortalidad	0/9 (0%)*	7/9 (78%)	8/10 (80%)
Latencia de aparición (días)	-	14 \pm 1,9**	17 \pm 2,8
Latencia de muerte (días)	>120	42 \pm 3	45 \pm 4

Días	Tamaño tumoral (mm ²)***		
10	-	19 \pm 13**	14 \pm 14
11	-	35 \pm 18	25 \pm 17
12	-	60 \pm 23	41 \pm 26
13	-	63 \pm 29	49 \pm 30
14	-	72 \pm 31	57 \pm 31
17	-	123 \pm 39	116 \pm 38
18	-	157 \pm 49	163 \pm 47
19	-	186 \pm 52	201 \pm 59
21	-	216 \pm 55	264 \pm 65
24	-	337 \pm 22	346 \pm 72
27	-	485 \pm 89	432 \pm 89

* n/total

** $\bar{x} \pm$ ES

*** Considerando solamente los animales en los cuales
el tumor creció

a $p < 0.001$ entre I y II y entre I y III

TABLA 5

EFFECTO DEL MPA Y DEL EXCIPIENTE ADMINISTRADOS 3 DIAS DESPUES DE LA INOCULACION s.c. DE UNA SUSPENSION CELULAR (10^5) DE UN FIBROSARCOMA (Px) EN RATONES BALB/c

	I	II	III
	Px + MPA	Px + Excipiente	Px + Sol.Fisiol.
Mortalidad	8/9 (89%)*	8/9 (89%)	7/9 (78%)
Latencia de aparicion (días)	20 \pm 3,8**	28 \pm 4,5 ^a	13 \pm 1,2
Latencia de muerte (días)	48 \pm 4	62 \pm 6	41 \pm 2

Días	Tamaño tumoral (mm ²) ***		
10	0	0	24 \pm 13
11	10 \pm 10	0	39 \pm 20
12	11 \pm 11	0	51 \pm 25
13	19 \pm 18	1,5 \pm 1,5	55 \pm 25
14	83 \pm 45	3 \pm 3	71 \pm 29
17	146 \pm 51	22 \pm 12	127 \pm 37
18	175 \pm 57	42 \pm 19	208 \pm 49
19	200 \pm 69	61 \pm 24	244 \pm 45
20	238 \pm 77	68 \pm 37	242 \pm 48
21	314 \pm 94	135 \pm 52	226 \pm 60
24	421 \pm 91	168 \pm 66	532 \pm 63

* n/total

** $\bar{x} \pm ES$

*** Considerando solamente los animales en los cuales el tumor creció

a $p < 0.01$ entre II y III

aparición de los tumores, se prolongó pero los resultados son difíciles de evaluar, ya que el excipiente tuvo un efecto similar al de la hormona.

iii. Administración de MPA al día 7 del inóculo tumoral

En la Tabla 6 se observan los resultados que se obtuvieron cuando se administró MPA 7 días después del inóculo tumoral. Si bien es mayor la latencia de aparición de tumores, lo mismo que la latencia de muerte en los animales tratados con MPA, el porcentaje de mortalidad fue menor en el grupo control tratado con excipiente

Conclusión

Se puede concluir que el MPA inhibió el crecimiento de un fibrosarcoma singeneico sólo cuando fue administrado junto con el inóculo tumoral, ya sea mediante trócar o en suspensión celular.

2. Leucemia Linfoblástica (LB)

Con el fin de determinar si el efecto observado con MPA sobre el fibrosarcoma era específico para el mismo o si era un efecto inespecífico para cualquier tumor, se repitieron los experimentos utilizando dos tumores trasplantables: una leucemia linfoblástica (LB) y un carcinoma epidermoide indiferenciado (CEI).

a- Transplante de LB mediante trócar

Se inocularon ratones BALB/c con la leucemia LB mediante trócar junto con 50 mg de MPA (Depo Provera) el excipiente ó solución fisiológica. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 7. Mientras en los controles el tumor creció en todos los animales, en los tratados con MPA sólo creció en un 25 % de los animales; la latencia de muerte fue similar en los tres grupos.

TABLA 6

EFFECTO DEL MPA Y DEL EXCIPIENTE ADMINISTRADO 7 DIAS DESPUES DE LA INOCULACION s.c. DE UNA SUSPENSION CELULAR (10^5) DE UN FIBROSARCOMA (Px) EN RATONES BALB/c

	Px + MPA	Px + Excipiente	Px + Sol.Fisiol.
Mortalidad	8/9 (89%)*	5/9 (56%)	8/9 (89%)
Latencia de aparición (días)	25 \pm 5,4**	13 \pm 0,7	14 \pm 1,7
Latencia de muerte (días)	57 \pm 5	44 \pm 3	44 \pm 1
Días	Tamaño tumoral (mm ²) ***		
10	0	18 \pm 18	13 \pm 7
12	0	22 \pm 22	29 \pm 15
13	1,5 \pm 1,5	36 \pm 27	45 \pm 19
14	2 \pm 2	68 \pm 30	59 \pm 19
18	39 \pm 26	174 \pm 64	91 \pm 21
19	37 \pm 23	173 \pm 54	175 \pm 39
20	46 \pm 21	221 \pm 55	192 \pm 37
27	175 \pm 54	472 \pm 54	455 \pm 55
33	349 \pm 90	740 \pm 95	735 \pm 44

* n/total

** $\bar{x} \pm$ ES

*** Considerando solamente los animales en los cuales el tumor creció

TABLA 7

EFFECTO DEL MPA Y DEL EXCIPIENTE SOBRE UNA LEUCEMIA
 LINFOBLASTICA (LB) TRANSPLANTADA POR VIA s.c.
 EN RATONES BALB/c

Grupo	Mortalidad		Latencia de muerte (días)
	n/total	%	
I LB + MPA	3/12 [*]	100	19 \pm 2
II LB + Excipiente	12 /12	100	20 \pm 2
III LB + Sol.Fisiol.	5/5	25	19 \pm 3

*p < 0.01 entre I y III y p < 0.001 entre I y II

b- Inoculación de una suspensión celular de LB

i. Inóculo tumoral junto con MPA

Se repitió el experimento anterior pero inoculando las células tumorales en suspensión por vía subcutánea junto con 50 mg de MPA, excipiente o solución fisiológica (en la misma jeringa). En la Tabla 8 se observan los resultados. No hubo crecimiento tumoral en los animales del grupo tratado con MPA mientras que en los controles hubo una mortalidad del 88 % en los que recibieron solución fisiológica y del 56 % en los que recibieron el excipiente.

ii. Administración de MPA al día 3 del inóculo tumoral

Se evaluó entonces que efecto tenía el MPA cuando era inoculado al día 3 después de la suspensión celular del tumor LB. Los resultados se observan en la Tabla 9. La mortalidad fue similar en los tres grupos ya sea el tratado con MPA, con excipiente o con solución fisiológica; la latencia de aparición de los tumores fue mayor en el grupo tratado con MPA, aunque la latencia de muerte fue similar en los tres grupos. Tanto en los tratados con excipiente como con MPA hubieron animales que murieron sin tumor palpable, aparentemente por una diseminación leucémica del tumor.

Conclusión

Se puede concluir que el tratamiento con MPA inhibió el crecimiento de una leucemia linfoblástica murina sólo cuando se la administró junto con el inóculo tumoral, ya sea mediante trócar o en suspensión celular.

TABLA 8

EFFECTO DEL MPA Y DEL EXCIPIENTE SOBRE UNA SUSPENSION
CELULAR (10^5) DE UNA LEUCEMIA LINFOBLASTICA (LB)
INOCULADA POR VIA s.c. EN RATONES BALB/c

	I	II	III
	LB + MPA	LB + Excipiente	LB + Sol.Fisiol.
Mortalidad	0/9 (0%)*	5/9 (56%)	8/9 (88%)
Latencia de aparición (días)	-	21 \pm 1,9** ^b	15,6 \pm 0,8
Latencia de muerte (días)	>120	35 \pm 2,3	34,5 \pm 1,8

Días	Tamaño tumoral (mm ²)***		
13	0	0	20 \pm 14
15	0	0	104 \pm 34
18	0	32 \pm 18	245 \pm 55
21	0	222 \pm 82	540 \pm 61
24	0	399 \pm 118	632 \pm 49
26	0	490 \pm 151	661 \pm 72

* n/total

** $\bar{x} \pm ES$

*** Considerando solamente los animales en los cuales el tumor creció

a $p < 0.01$ entre I y II y $p < 0.001$ entre I y III

b $p < 0.01$ entre II y III

TABLA 9

EFFECTO DEL MPA Y DEL EXCIPIENTE ADMINISTRADO 3 DIAS DESPUES DE LA INOCULACION s.c. DE UNA SUSPENSION CELULAR (10^5) DE UNA LEUCEMIA LINFOBLASTICA (LB) EN RATONES BALB/c

	LB + MPA	LB + Excipiente	LB + Sol.Fisiol.
Mortalidad			
con tumor	4/9 (44%)*	5/9 (56%)	6/9 (67%)
sin tumor	4/9 (44%)**	3/9 (33%)	-
Latencia de aparición (días)	24,7 \pm 3,9	19,4 \pm 4,7	19 \pm 2,4
Latencia de muerte (días)			
con tumor	37,2 \pm 7,8	36 \pm 5,3	36 \pm 2,6
sin tumor	39,5 \pm 4,9	50 \pm 8	-
Días	Tamaño tumoral (mm^2)***		
15	0	91 \pm 47	35 \pm 25
18	52 \pm 12	194 \pm 88	162 \pm 66
21	97 \pm 97	499 \pm 167	286 \pm 102
24	130 \pm 123	543 \pm 143	388 \pm 139
26	43 \pm 33	531 \pm 182	363 \pm 125
28	62 \pm 38	609 \pm 304	385 \pm 130

* n/total

** \bar{x} \pm ES

*** Considerando solamente los animales en los cuales el tumor creció

3. Carcinoma Epidermoide Indiferenciado (CEI)

a- Inoculación mediante trócar

Ratones BALB/c fueron trasplantados con el tumor CEI subcutáneamente mediante trócar junto con 50 mg de MPA, excipiente o solución fisiológica. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 10. No hubo diferencia de mortalidad en los tres grupos ya que el tumor creció en todos los animales. Sólo se observó un aumento de latencia de muerte en los ratones tratados con MPA, posiblemente porque el tumor creció un poco más lentamente lo que se ve reflejado en el tamaño tumoral.

Conclusión

El MPA cuando es inoculado junto con un trasplante de un carcinoma epidermoide indiferenciado no tiene efecto sobre la incidencia tumoral pero produce un retardo en el crecimiento del tumor.

De estos experimentos in vivo se puede concluir que el MPA inhibió el crecimiento de un fibrosarcoma y de una leucemia linfoblástica murina cuando fueron inoculados mediante trócar o en suspensión celular junto con 50 mg de la hormona. Cuando el MPA se inoculó días más tarde que el tumor, si bien aumentó la latencia de aparición y de muerte de los tumores, los resultados no son claros porque el excipiente a veces ejerce el mismo efecto. Con respecto al carcinoma epidermoide indiferenciado, el MPA no alteró la incidencia tumoral pero produjo un retardo del crecimiento del tumor.

TABLA 10

EFFECTO DEL MPA Y DEL EXCIPIENTE SOBRE UN CARCINOMA
EPIDERMÓIDE INDIFERENCIADO (CEI) TRANSPLANTADO POR
VIA s.c. EN RATONES BALB/c

	I	II	III
	CEI + MPA	CEI + EXCIPIENTE	CEI + SOL.FISIOI.
Mortalidad	11/11 (100%) *	12/12 (100%)	12/12 (100%)
Latencia de muerte (días)	83 \pm 6,1 ^a **	56 \pm 2,8	66 \pm 6

Día	Tamaño tumoral (mm ² ;		
19	63 \pm 27**	189 \pm 27	144 \pm 23
25	120 \pm 55	365 \pm 45	339 \pm 30
45	469 \pm 100	1029 \pm 78	870 \pm 73

* n/total

** $\bar{x} \pm ES$

a $p < 0.001$ ente I y II

II. EFECTO DEL MPA SOBRE LA INDUCCION DE SARCOMAS POR CUERPO EXTRAÑO

Pareció interesante evaluar qué efecto tenía el MPA sobre la inducción de tumores por cuerpo extraño. Para ello se utilizó el modelo del cilindro de vidrio (CV) (140). Se comparó la incidencia de sarcomas en ratones BALB/c portadores de un CV tratados con MPA en la vecindad del mismo o en el flanco contralateral con los controles correspondientes.

En este tipo de experimentos a largo plazo (hasta 18 meses) una gran parte de los animales muere por causas ajenas a las esperadas por lo que resulta muy difícil evaluar qué número de animales hay que considerar en cada grupo para calcular la incidencia tumoral. Teniendo en cuenta el número de animales vivos en el momento en que apareció el primer tumor, el número de sarcomas en el grupo control es de 17/35, en el grupo tratado con MPA en el flanco contralateral, 9/30 y en el grupo tratado con MPA en la vecindad del CV, 4/30 (Tabla 11). Sin embargo este no es el número real de animales expuestos a riesgo ya que muchos de ellos murieron por otras causas, sin tumor, o sea que se los consideró como tumor negativo, y si hubieran vivido, a lo mejor hubieran desarrollado un tumor. Es por ello que se recurrió a un método estadístico extraído de un trabajo de Covelli y col (141) donde se divide todo el tiempo que dura el experimento en intervalos y se calcula el número de animales expuestos a riesgo en cada intervalo mediante la fórmula:

$$n' = n - 0.5 (z + w)$$

donde n : es el número de animales vivos al comenzar el intervalo; z : el número de animales que muere por otras causas y w : animales que salen del experimento porque en nuestro caso rechazan el cuerpo extraño.

Así se calcula el porcentaje de fibrosarcomas como el número

TABLA 11

EFFECTO DEL MPA SOBRE LA INDUCCION DE TUMORES POR
IMPLANTACION s.c. DE UN CILINDRO DE VIDRIO (CV)

	Sarcoma/n*	%	% corregido**	CaMa/n Q
MPA intra CV	4/30	13	25,5	6/13
MPA contralateral	9/30	30	53,3	3/7
CV solo	17/35	49	79,5	1/9

n* : número de ratones vivos a la fecha en que apareció el primer tumor.

** : teniendo en cuenta el número de animales expuestos a riesgo en cada intervalo de tiempo (n')

de sarcomas aparecidos en un intervalo dividido n' y a este valor se le agrega el porcentaje de sarcomas obtenido en el intervalo anterior. En la Tabla 12 se observa como fueron calculados en el grupo control con CV solo, los porcentajes de sarcomas aparecidos en cada intervalo (diez semanas), llegando así al valor final de 17 %. En la Tabla 13 se observa cómo fueron calculados estos valores en el grupo portador de CV y tratado con MPA en el flanco contralateral llegando a un valor de 53 % y en la Tabla 14 los valores para el grupo portador de CV y tratado con MPA en la vecindad del mismo, llegando a un valor final de 26 %. Estos resultados se encuentran graficados en la figura 3. Para poder evaluar si las diferencias en la aparición de tumores en los tres grupos eran significativas fue necesario transformarlos en $\text{arc sen } \sqrt{\% \text{ sarcomas}}$ en función del tiempo para poder hacer la distribución normal (142). En la tabla 15 se observan las transformaciones que se hicieron y se encuentran graficadas en la Figura 4. Por el análisis de la covariancia se demostró que son significativas las diferencias de aparición de tumores tanto en el grupo tratado con MPA contralateral al CV como en el grupo tratado con MPA en la vecindad del mismo con respecto al control ($p < 0.001$). Se compararon también las pendientes y el análisis demostró que es significativa ($p < 0.05$) la diferencia de pendiente entre el grupo control y el inoculado con MPA en la vecindad del CV mientras que no es significativa la diferencia de pendiente entre el control y el grupo inoculado con MPA contralateral al CV. Esto significa que el ritmo de aparición de tumores fue diferente en el grupo tratado con MPA en la vecindad del CV y del grupo control mientras que en el grupo tratado con MPA en el flanco contralateral, si bien el porcentaje de aparición fue significativamente mas bajo que el control, el ritmo de aparición de los tumores fue el mismo.

TABLA 12

CALCULO DE LAS FRECUENCIAS RELATIVAS ACUMULADAS DE SARCOMAS
EN RELACION CON EL TIEMPO DE APARICION. GRUPO CONTROL CON CV

Intervalo en semanas	n'	N° de sarcomas/n'	%	% acumulado
0-10	$39-0,5(0+0) = 39$	0/39		
10-20	$39-0,5(2+0) = 38$	0/38		
20-30	$37-0,5(0+0) = 37$	0/37		
30-40	$37-0,5(1+0) = 36,5$	2/36,5	5,48	5,48
40-50	$(36-2)-0,5(1+2) = 32,5$	7/32,5	21,54	27,02
50-60	$(31-7)-0,5(1+0) = 23,5$	2/23,5	8,51	35,53
60-70	$(23-2)-0,5(4+2) = 18$	3/18	16,66	52,19
70-80	$(15-3)-0,5(1+1) = 11$	3/11	27,27	79,46

n' : $n-0,5(z+w)$ Número de animales expuestos a riesgo en
cada intervalo

n : número de animales vivos al comenzar el intervalo

z : animales muertos por otras causas

w : animales que salieron del experimento (rechazaron
el CV o murieron de otros tumores)

TABLA 13

CALCULO DE LAS FRECUENCIAS RELATIVAS ACUMULADAS DE SARCOMAS EN RELACION CON EL TIEMPO DE APARICION EN RATONES BALB/c PORTADORES DE CV TRATADOS CON MPA EN EL FLANCO CONTRALATERAL

Intervalo en semanas	n'	N° de Sarcomas/n'	%	% acumulado
0-10	$41-0,5(1+0) = 40,5$	0/40,5	0	-
10-20	$40-0,5(2+1) = 38,5$	0/38,5	0	-
20-30	$37-0,5(1+4) = 34,5$	0/34,5	0	-
30-40	$32-0,5(0+0) = 32$	0/32	0	-
40-50	$32-0,5(1+2) = 30,5$	2/30,5	6,56	6,56
50-60	$(29-2)-0,5(2+2) = 25$	2/25	8	14,56
60-70	$(21-2)-0,5(4+0) = 17$	3/17	17,65	32,21
70-80	$(15-3)-0,5(3+2) = 9,5$	2/9,5	21,05	53,26

n' : $n-0,5(z+w)$ Número de animales expuestos a riesgo en cada intervalo

n : número de animales al comenzar el intervalo

z : animales muertos por otras causas

w : animales que salieron del experimento (rechazaron el CV o murieron de otros tumores)

TABLA 14

CALCULO DE LAS FRECUENCIAS RELATIVAS ACUMULADAS DE SARCOMAS EN RELACION CON EL TIEMPO DE APARICION EN RATONES BALB/c PORTADORES DE CV TRATADOS CON MPA EN LA VECINDAD DEL CV

Intervalo en semanas	n'	Nºde sarcomas/n'	%	% acumulado
0-10	$38 - 0,5(0+0) = 38$	0/38	0	-
10-20	$38 - 0,5(0+1) = 37,5$	0/37,5	0	-
20-30	$37 - 0,5(2+1) = 35,5$	0/35,5	0	-
30-40	$34 - 0,5(1+1) = 33$	0/33	0	-
40-50	$32 - 0,5(2+3) = 29,5$	1/29,5	3,39	3,39
50-60	$(27-1) - 0,5(0+1) = 25,5$	2/25,5	7,84	11,23
60-70	$(25-2) - 0,5(11+4) = 15,5$	0/15,5	0	11,23
70-80	$8 - 0,5(1+1) = 7$	1/7	14,28	25,51

n': $n - 0,5(z+w)$ Número de animales expuestos a riesgo en cada intervalo

n : número de animales vivos al comenzar el intervalo

z : animales muertos por otras causas

w : animales que salieron del experimento (rechazaron el CV o murieron de otros tumores)

Figura 3 : Tumorigenesis por cuerpo extraño. Frecuencias relativas (acumuladas) de tumores inducidos por un cilindro de vidrio (CV) en ratones BALB/c tratados con acetato de medroxiprogesterona (MPA) en la vecindad del CV o en el flanco contralateral al mismo

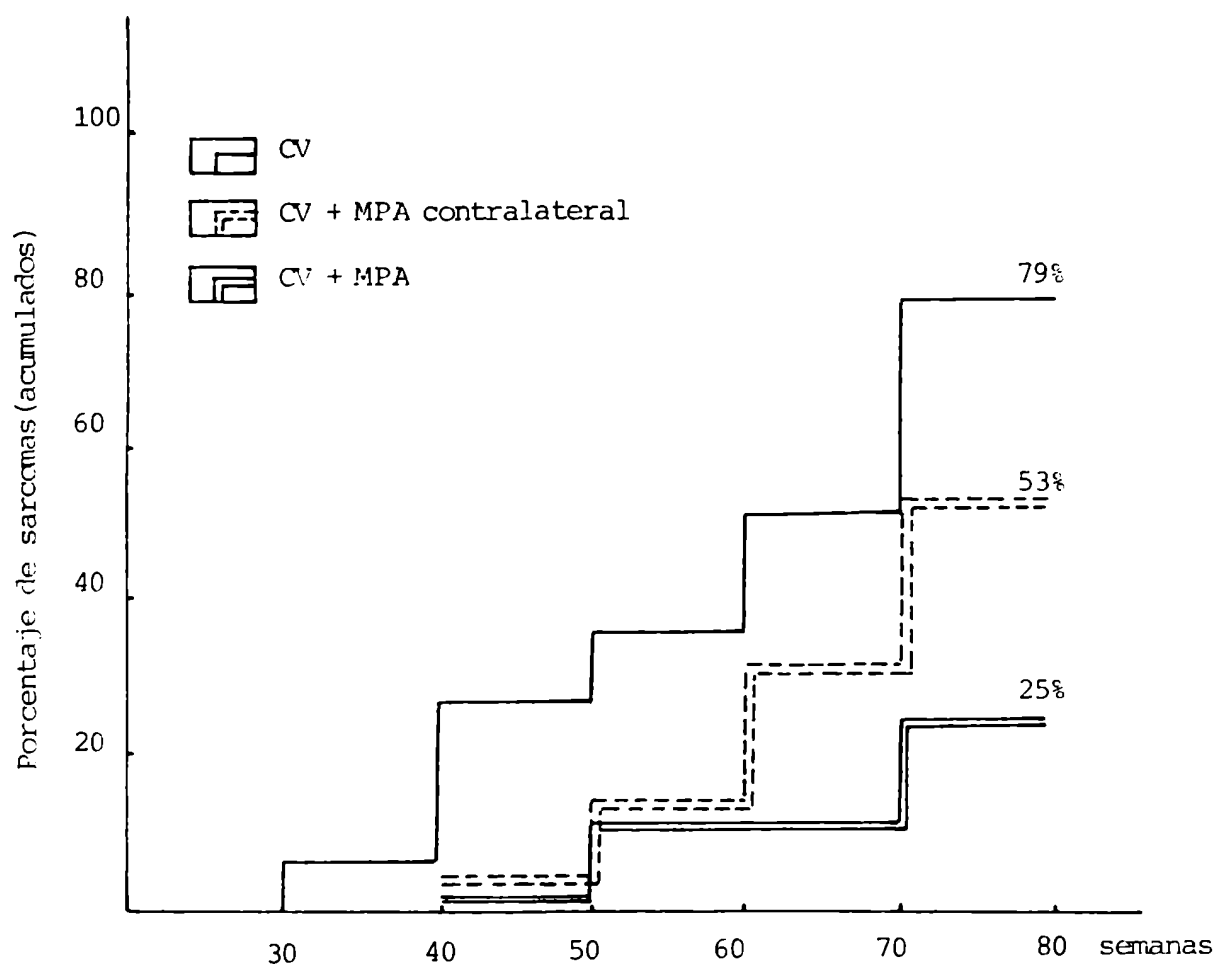


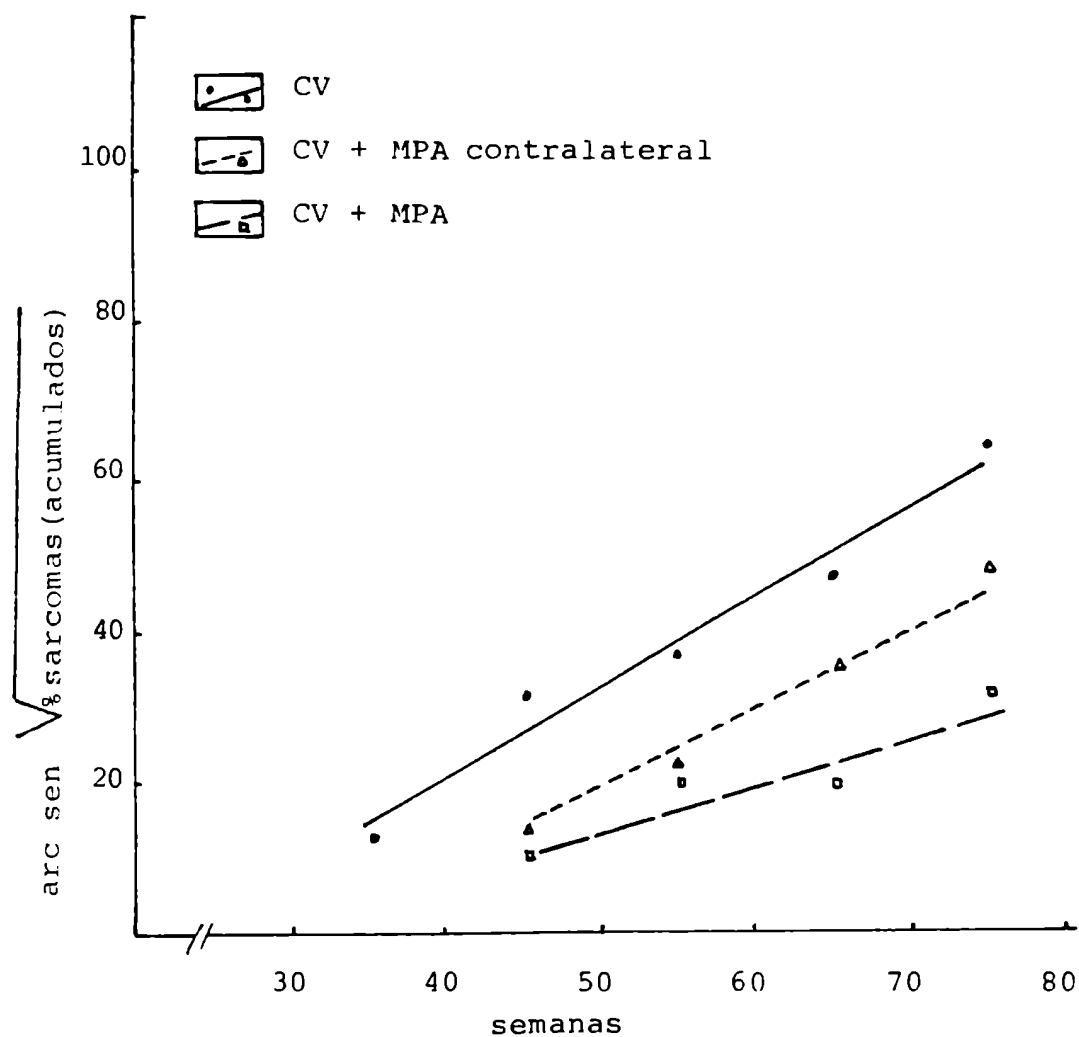
TABLA 15

TRANSFORMACION LINEAL DE LAS FRECUENCIAS RELATIVAS ACUMULADAS DE SARCOMAS EN RELACION
CON EL TIEMPO DE APARICION EN RATONES BALB/c PORTADORES DE CV Y TRATADOS CON MPA

Tiempo en semanas	CV		CV + MPA contralateral		CV + MPA intra CV	
	% Sarc. acum.	arc sen $\sqrt{\% \text{ sarc. acum.}}$	% Sarc. acum.	arc sen $\sqrt{\% \text{ sarc. acum.}}$	% Sarc. acum.	arc sen $\sqrt{\% \text{ sarc. acum.}}$
35	5,5	13,6	-	-	-	-
45	27	31,3	6,6	14,8	3,4	10,6
55	35,5	36,6	14,6	22,4	11,2	19,6
65	52,2	46,2	32,2	34,6	11,2	19,6
75	79,5	63,1	53,3	46,9	25,5	30,3

* Punto medio del intervalo

Figura 4 : Tumorigenesis por cuerpo extraño. Transformación lineal de las frecuencias relativas (acumuladas) de tumores inducidos por un cilindro de vidrio (CV) en ratones BALB/c tratados con acetato de medroxi-progesterona (MPA) en la vecindad del CV o en el flanco contralateral al mismo



Histológicamente los tumores fueron similares en los tres grupos e incluyeron sarcomas de células fusiformes y sarcomas de células redondas. Los primeros consistían en células alargadas de tipo fibroblástico con alta actividad mitótica (Figura 5 y 6) abundantes fibras de reticulina y buena vascularización. La técnica de tricrómico de Gomori dio diferentes resultados en diferentes áreas, algunas células se colorearon de azul mientras que otras de rojo sugiriendo un origen muscular; en un caso se encontraron áreas de cartílago inmaduro (Figura 7). Los sarcomas de células redondas demostraron tener mayor grado de atipia, con células gigantes multinucleadas mezcladas con células poligonales neoplásicas (Figura 8).

Un resultado inesperado fue la aparición de adenocarcinomas en las hembras inoculadas con MPA, los resultados se observan en la Tabla 11. Los tumores estaban localizados a lo largo de la línea mamaria excepto uno de tipo sebáceo ubicado en la región perianal que infiltraba la pared muscular del recto (Figura 9). La mayoría de los tumores eran poco diferenciados compuestos por grupos de células cilíndricas atípicas con pocas estructuras glandulares con secreción luminal PAS positiva (Figura 10). En la autopsia, los úteros agrandados, mostraron grandes cavidades quísticas revestidas por epitelio endometrial aplanado sin signos de secreción y llenas con material mucoso y leucocitos. También se encontró una hipertrofia de las glándulas salivales.

Debido a que el número de hembras utilizadas en este experimento es escaso, es difícil un análisis estadístico pero se están repitiendo estos experimentos en hembras debido a la importancia que tienen estos resultados preliminares.

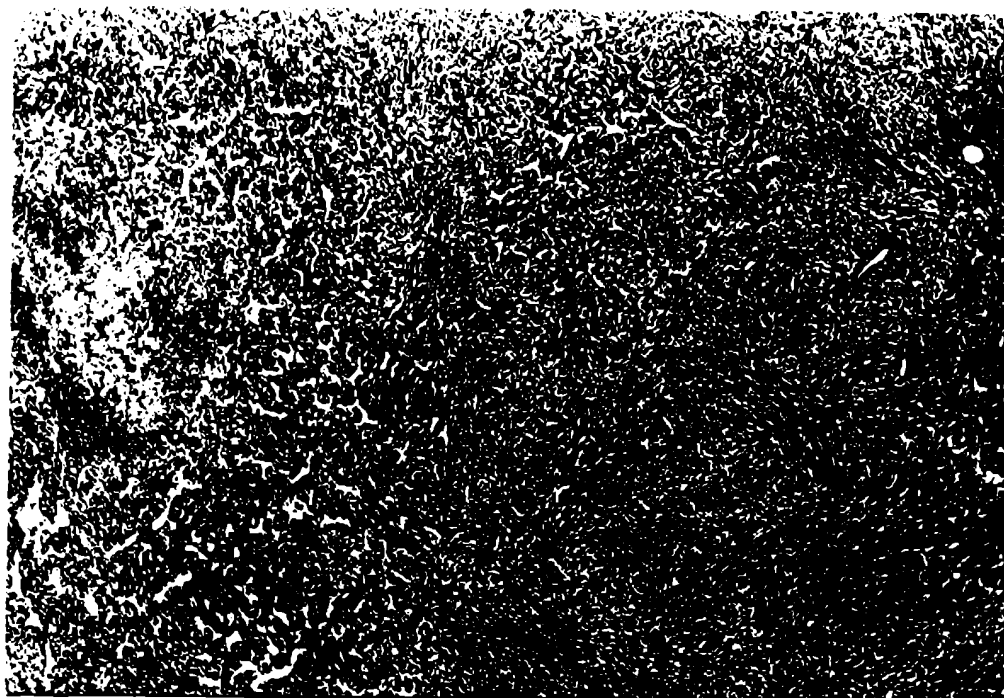


Figura 5: Imagen a bajo aumento de un sarcoma inducido por cuerpo extraño, constituido por células fusiformes dispuestas en haces de distribución irregular. Existen numerosos espacios vasculares que se dilatan rodeando un área necrótica (arriba izquierda) (Hematoxilina-eosina 40 X)

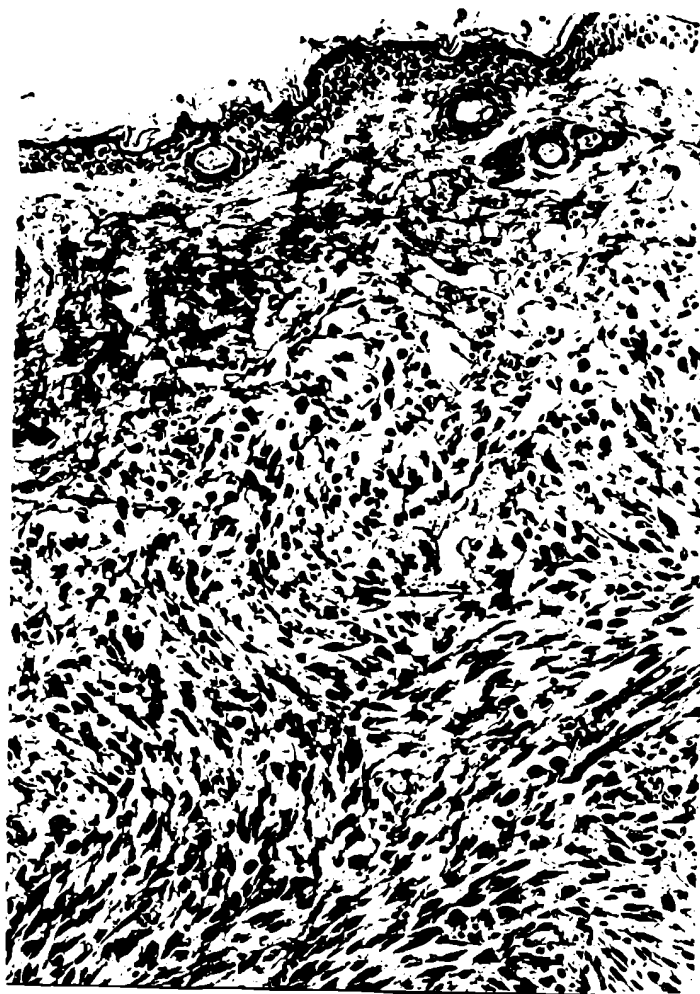


Figura 6: En su proliferación este sarcoma infiltra reemplazando casi totalmente los tejidos dérmicos. Obsérvense algunos folículos atróficos remanentes (Hematoxilina-eosina 125 X)



Figura 7: La fotografía muestra un área de cartílago que formaba parte de un sarcoma de células redondas. Los condrocitos muestran evidentes atipías. El mismo tumor tenía zonas de calcificación (Hematoxilina-eosina 200 X)

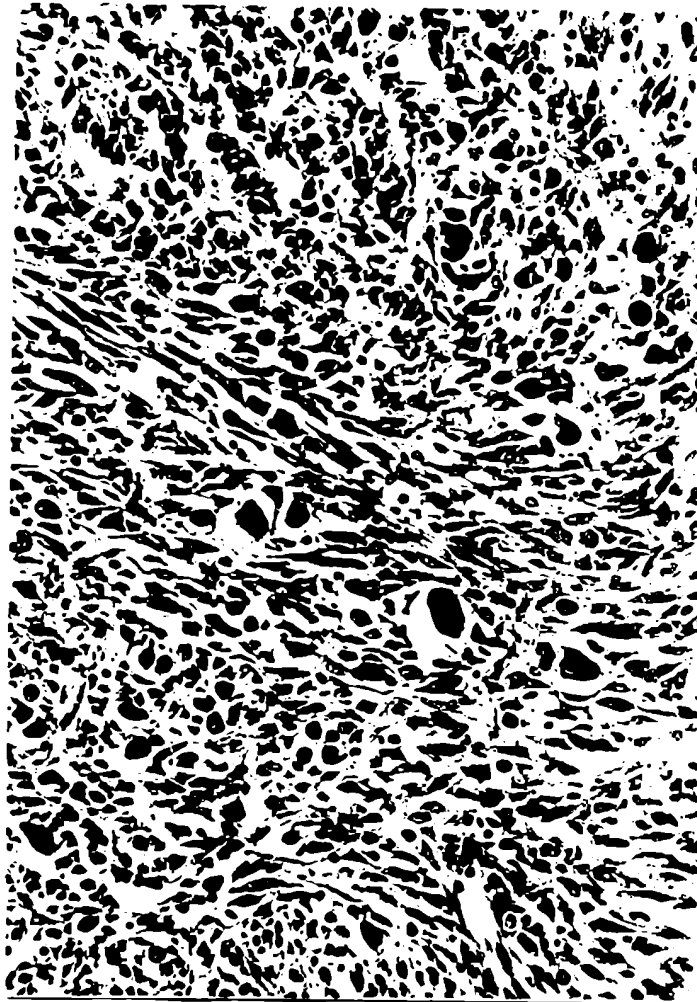


Figura 8: En el area que muestra la imagen, correspondiente a un sarcoma fusocelular se observan células gigantes, algunas multinucleadas con citoplasma granular, densamente eosinófilo. Estas células recuerdan a rabdomioblastos atípicos (Hematoxilina eosina 125 X)



Figura 9: Adenocarcinoma de tipo sebáceo. La lesión reemplaza los tejidos perirectales alcanzando sin infiltrarla, la muscularis mucosae.



Figura 10: Imagen a bajo aumento de un adenocarcinoma de mama. El tumor crece disociando el celular subcutáneo y está compuesto por una estructura quística (que estaba llena de un fluido muco-hemorrágico) tapizada por células neoplásicas que muestran un crecimiento sólido. En el área sólida se diferencian numerosas glándulas. En un extremo y a los costados de la masa se observan estructuras mamarias normales remanentes. (Hematoxilina-eosina 40 X)

· ESTUDIOS IN VITRO

I. EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE EL CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS Y TUMORALES MURINOS, CELULAS WISH Y HELA

Se evaluó el efecto citostático y citolítico de la progesterona sobre células en cultivo. Para ello se emplearon las técnicas de inhibición de incorporación de ^3H -Tim y marcación con ^{51}Cr de las células, medición del ^{51}Cr liberado al sobrenadante después de incubar con distintas concentraciones de progesterona.

1. Inhibición de incorporación de ^3H -Tim

a- Fibroblastos embrionarios murinos

i. 24 horas de incubación

En la Tabla 16 y en la figura 12 se observan los resultados que se obtuvieron después de incubar los fibroblastos embrionarios con concentraciones crecientes de progesterona durante 24 horas. En los 5 experimentos se observa que la progesterona inhibió el crecimiento de los mismos ya que los grupos experimentales incorporaron menos timidina que los controles. El etanol, diluyente de la progesterona no alteró el crecimiento de las células en las concentraciones utilizadas. La disminución de incorporación de ^3H -Tim comenzó a manifestarse en concentraciones de $8 \times 10^{-6}\text{M}$ llegando a ser total en concentraciones de $7-10 \times 10^{-5}\text{M}$.

ii. 72 horas de incubación

También se evaluó si incubando la hormona durante más tiempo con las células a una concentración menor, se observaba el mismo efecto inhibitorio. Sin embargo en la Tabla 17 se observa que después de incubar las células durante 72 hs.

TABLA 16

EFFECTO DE LA PROGESTERONA (P) SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS MURINOS. INCORPORACION DE 3H-TIM (CPM) Y PORCENTAJE CON RESPECTO A LOS CONTROLES

Concentración de P x 10 ⁵ M	Exp. CPM	1 %	Exp. CPM	2 %	Exp. CPM	3 %	Exp. CPM	4 %	Exp. CPM	5 %
0,44	20956 ± 467	76	-	-	7393 ± 233	78	-	-	-	-
0,66	-	-	-	-	7266 ± 264	77	-	-	-	-
0,88	17786 ± 1749	65	7996 ± 192	74	8116 ± 811	86	-	-	-	-
1,3	-	-	6359 ± 111	59	6788 ± 409	71	-	-	-	-
1,8	10495 ± 46	38	6168 ± 599	57	5893 ± 114	62	-	-	-	-
2,6	-	-	-	-	5516 ± 42	58	-	-	-	-
3,5	4756 ± 497	17	3350 ± 206	31	4907 ± 512	52	17657 ± 1574	42	32496 ± 1514	60
5,2	-	-	1404 ± 62	13	2909 ± 237	31	-	-	-	-
7	884 ± 29	3	631 ± 21	6	90 ± 43	1	8138 ± 739	20	5787 ± 179	11
1	-	-	341 ± 57	3	36 ± 14	1	2949 ± 237	7	2700 ± 167	5
14	152 ± 15	6	87 ± 15	1	-	-	-	-	1241 ± 153	2
Etanol %	23099 ± 1668	-	7794 ± 1037	-	9484 ± 801	-	49915 ± 3010	-	53431 ± 704	-
Medio	27397 ± 2926	-	10768 ± 976	-	-	-	41745 ± 4349	-	54612 ± 1974	-

* X ± ES

Figura 12: Efecto de la progesterona sobre el crecimiento in vitro de fibroblastos embrionarios murinos. Porcentaje de incorporación de ^3H -Tim con respecto a controles sin tratar

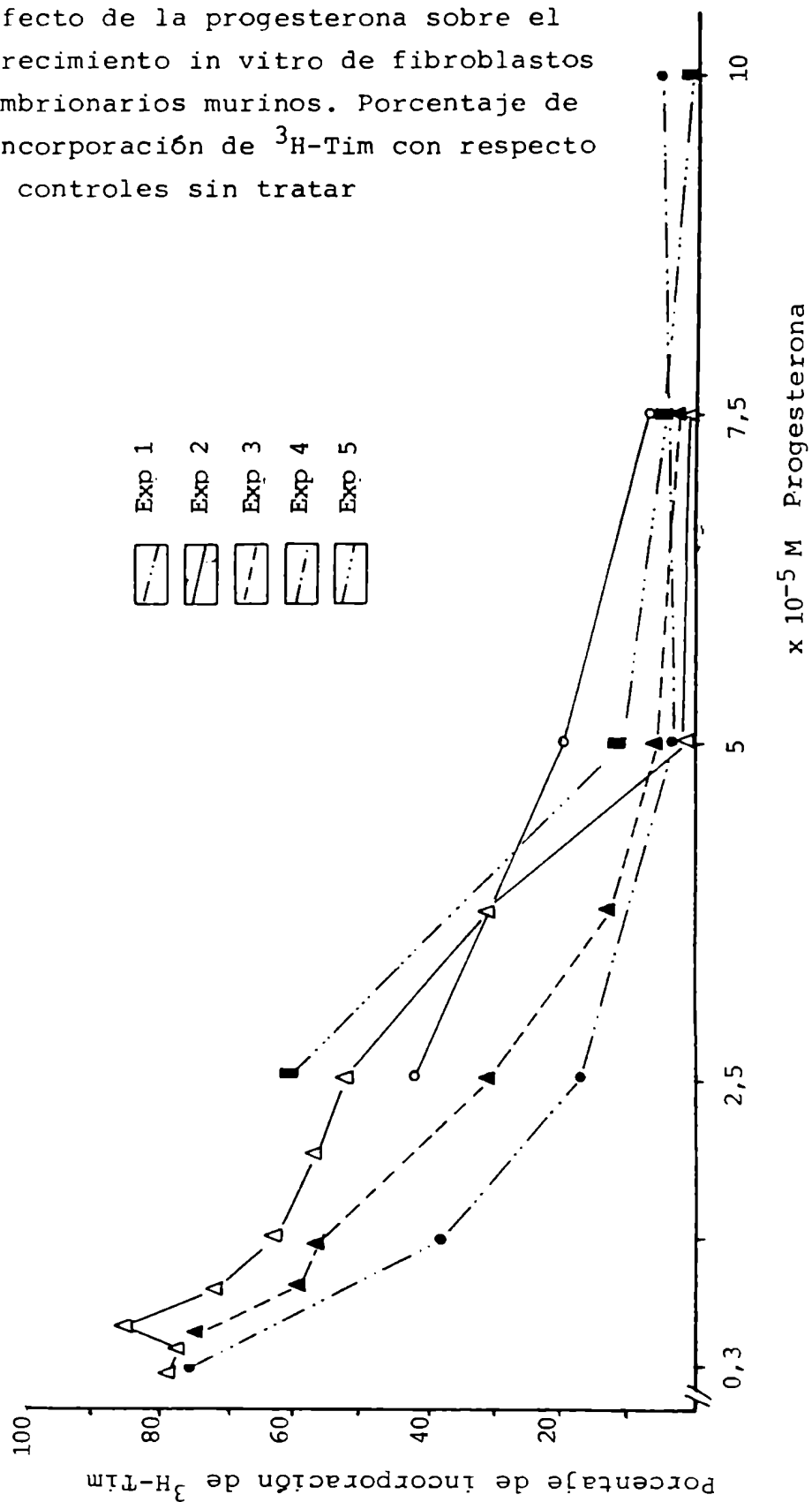


TABLA 17

EFFECTO DE LA PROGESTERONA (P) SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DESPUES DE 72 HORAS DE INCUBACION. INCORPORACION DE ^3H -TIM (CPM) Y PORCENTAJE DE INCORPORACION CON RESPECTO A CONTROLES SIN TRATAR

Concentración de P	Exp. 1		Exp. 2	
	CPM *	%	CPM	%
$1,4 \times 10^{-8}\text{M}$	9671 ± 804	119	20273 ± 1126	97
$1,4 \times 10^{-7}\text{M}$	9739 ± 921	120	23341 ± 840	111
$1,4 \times 10^{-6}\text{M}$	9526 ± 1320	117	22081 ± 1089	105
$1,4 \times 10^{-5}\text{M}$	4042 ± 413	50	9651 ± 920	46
$1,4 \times 10^{-4}\text{M}$	51 ± 10	1	651 ± 101	3
Medio	8073 ± 587		20846 ± 1109	
Etanol	10437 ± 745		18031 ± 1175	

* $\bar{X} \pm \text{ES}$

el porcentaje de incorporación de timidina fue igual que cuando la incubación se hizo durante 24 horas (Tabla 16).

iii. Reversibilidad

Con el fin de determinar si el efecto inhibitorio de la progesterona era reversible o no, se comparó su efecto sobre cultivos de fibroblastos de 72 horas con los incubados durante 48 horas con la hormona y luego lavados e incubados con medio. Como se observa en la Tabla 18, los fibroblastos lavados incorporan más timidina que los tratados, comprobándose así la reversibilidad del efecto.

b- Fibroblastos tumorales murinos (24 hs. de incubación)

En la Tabla 19 y en la Figura 13 se observan los resultados obtenidos después de incubar los fibroblastos tumorales murinos con concentraciones crecientes de progesterona. Al igual que los fibroblastos embrionarios, los tumorales incorporan menos ^3H -Tim que los controles en un rango que oscila entre $7 \times 10^{-6}\text{M}$ y $1 \times 10^{-4}\text{M}$.

c- Células WISH (24 hs de incubación)

En la Tabla 20 y en la Figura 14 se observan los resultados que se obtuvieron al incubar las células WISH con concentraciones crecientes de P. Al igual que en los casos anteriores la progesterona inhibió el crecimiento de estas células en un rango de concentración similar a los fibroblastos, siendo las células WISH un poco menos sensibles en las concentraciones más altas.

d- Células HELA (24 hs de incubación)

En la Tabla 21 y en la Figura 15 se observan los resultados que se obtuvieron al incubar las células HELA con concen-

TABLA 18

REVERSIBILIDAD DEL EFECTO INHIBITORIO DE LA PROGESTERONA (P).
 INCORPORACION DE ^3H -TIM POR FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS INCUBADOS
 DURANTE 48 HORAS CON P Y LUEGO 24 HORAS CON MEM-SFB COMPARANDOLO
 CON FIBROBLASTOS INCUBADOS DURANTE 72 HORAS CON LA HORMONA

	Concentraciones de P	Exp. 1 CPM*	Exp. 2 CPM
Fibroblastos embrionarios incubados 72 hs con p	Control	6450 \pm 666	20846 \pm 1109
	10^{-5}M	2961 \pm 594 ^a	9651 \pm 920 ^d
	$5 \times 10^{-4}\text{M}$	378 \pm 52 ^b	-
	10^{-4}M	108 \pm 59 ^c	651 \pm 101 ^e

Fibroblastos embrionarios incubados 48 hs con P y 24 hs con MEM-SFB	Control	6656 \pm 1018	-
	10^{-5}M	5381 \pm 547 ^a	18067 \pm 3414 ^d
	$5 \times 10^{-4}\text{M}$	1067 \pm 97 ^b	-
	10^{-4}M	580 \pm 35 ^c	3793 \pm 1182 ^e

* $\bar{X} \pm \text{ES}$

a: $p < 0.002$

b,c,d: $p < 0.001$

e: $p < 0.05$

TABLA 19

EFFECTO DE LA PROGESTERONA (P) SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE FIBROBLASTOS TUMORALES MURINOS. INCORPORACION DE ^3H -TIM (CPM) Y PORCENTAJE DE INCORPORACION CON RESPECTO A CONTROLES SIN TRATAR

Concentración de P x 10^{-5}M	Exp. 1 CPM * %	Exp. 2 CPM %	Exp. 3 CPM %	Exp. 4 CPM %
0,014	-	-	8114+329 88	-
0,14	-	-	8964+779 97	3676+560 83
0,77	-	-	5818+37 63	-
1,4	-	-	4317+213 47	779+109 18
1,8	6388+322 10			-
3,5	5387+293 9	8080+1973 50	-	-
7	2233+134 4	4800+467 30	-	-
7	-	-	435+50 5	92+19 2
10	1042+47 2	2576+293 16	-	-
14	-	144+18	71+10 1	70+9 2
Medio	61925+5694	16216+1156	9202+778	4423+164
Etanol	56070+1856	22484+1715		

* $\bar{X} \pm \text{ES}$

Figura 13: Efecto de la progesterona sobre el crecimiento in vitro de fibroblastos tumorales murinos. Porcentaje de incorporación con respecto a controles sin tratar

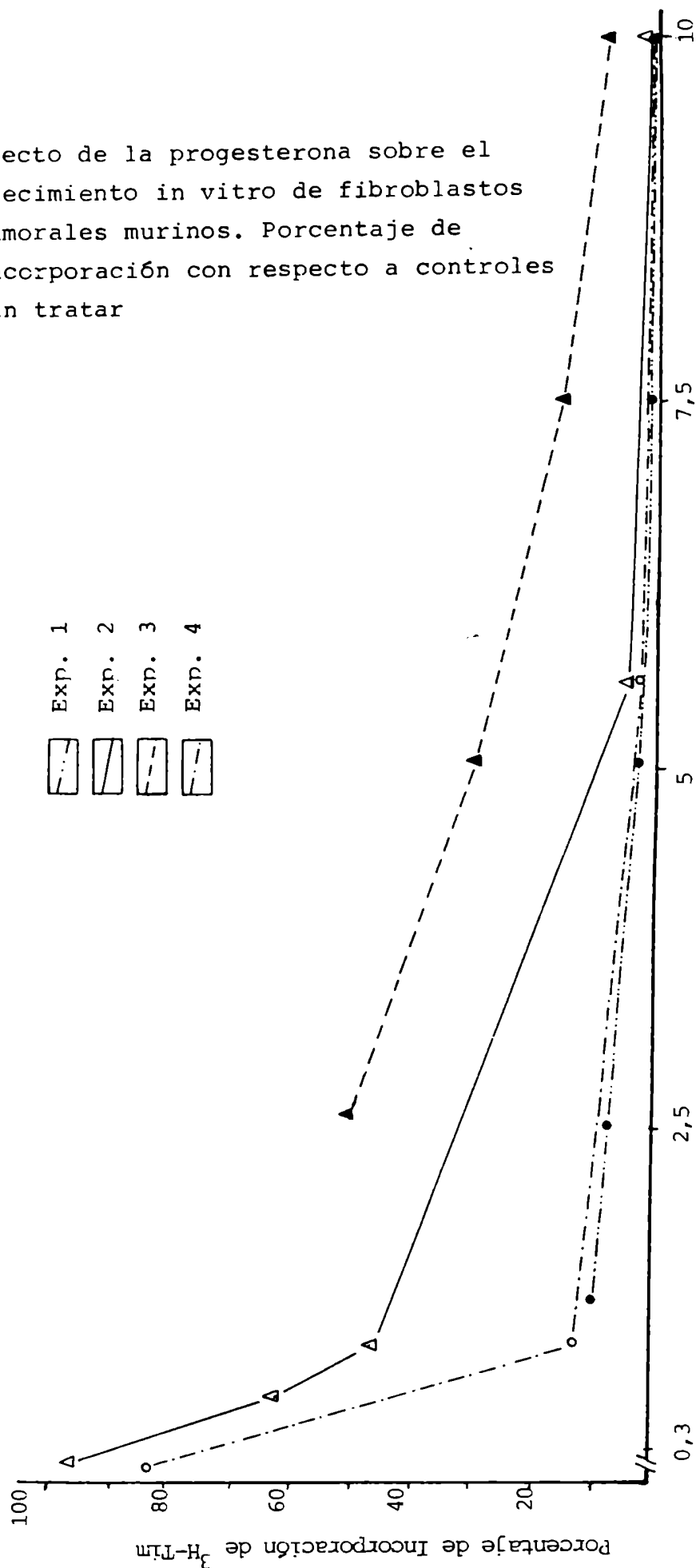


TABLA 20

EFFECTO DE LA PROGESTERONA (P) SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE CELULAS WISH. INCORPORACION DE ^3H -TIM (CPM) Y PORCENTAJE DE INCORPORACION CON RESPECTO A CONTROLES SIN TRATAR

Concentración de P x 10^5 M	Exp. * CPM	1 %	Exp. 2 CPM	%	Exp. 3 CPM	%	Exp. 4 CPM	%
0,22	13413+695	99	-		-		-	
0,44	9961+291	73	-		-		-	
0,87	7846+474	58	13052+684	81	11659+677	65	7792+324	74
1,3	8507+95	63	-		-		-	
1,7	7217+689	53	3530+196	22	11246+654	63	7833+303	74
2,6	7241+234	53	-		-		-	
3,5	7277+691	54	2129+192	13	8603+474	48	6494+1029	61
4,4	6563+476	48	-		-		-	
5,3	5941+378	44	-		-		-	
6,1	5450+386	40	-		-		-	
7,0	3939+207	29	1171+60	7	4688+251	26	4998+307	47
8,7	3728+163	27	-		-		-	
11	3050+220	22	785+27	5	1249+60	7	1266+113	12
12	1314+ 91	10	-		-		-	
14	1422+178	10	359+6	2	1200+64	7	-	
18	-		342+155	2	1383+80		-	
21	-		174+18	1	17872+918		-	
Medio	13615+735		-		14346+879		10613+415	
Etanol %	-		16168+475				10220+745	

* $\bar{X} \pm \text{ES}$

Figura 14: Efecto de la progesterona sobre el crecimiento in vitro de células WISH. Porcentaje de incorporación de ^3H -Tim con respecto a controles sin tratar.

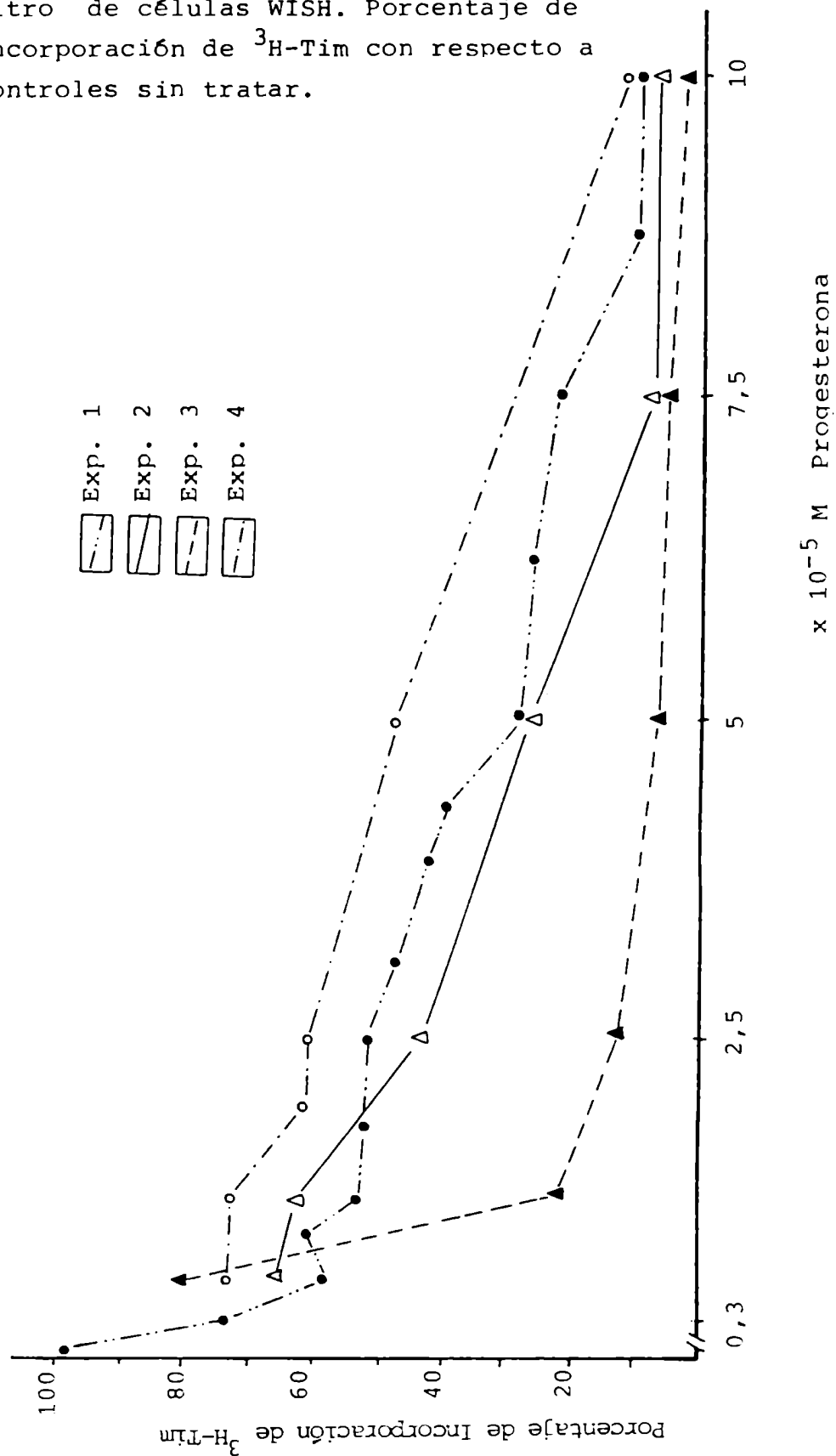


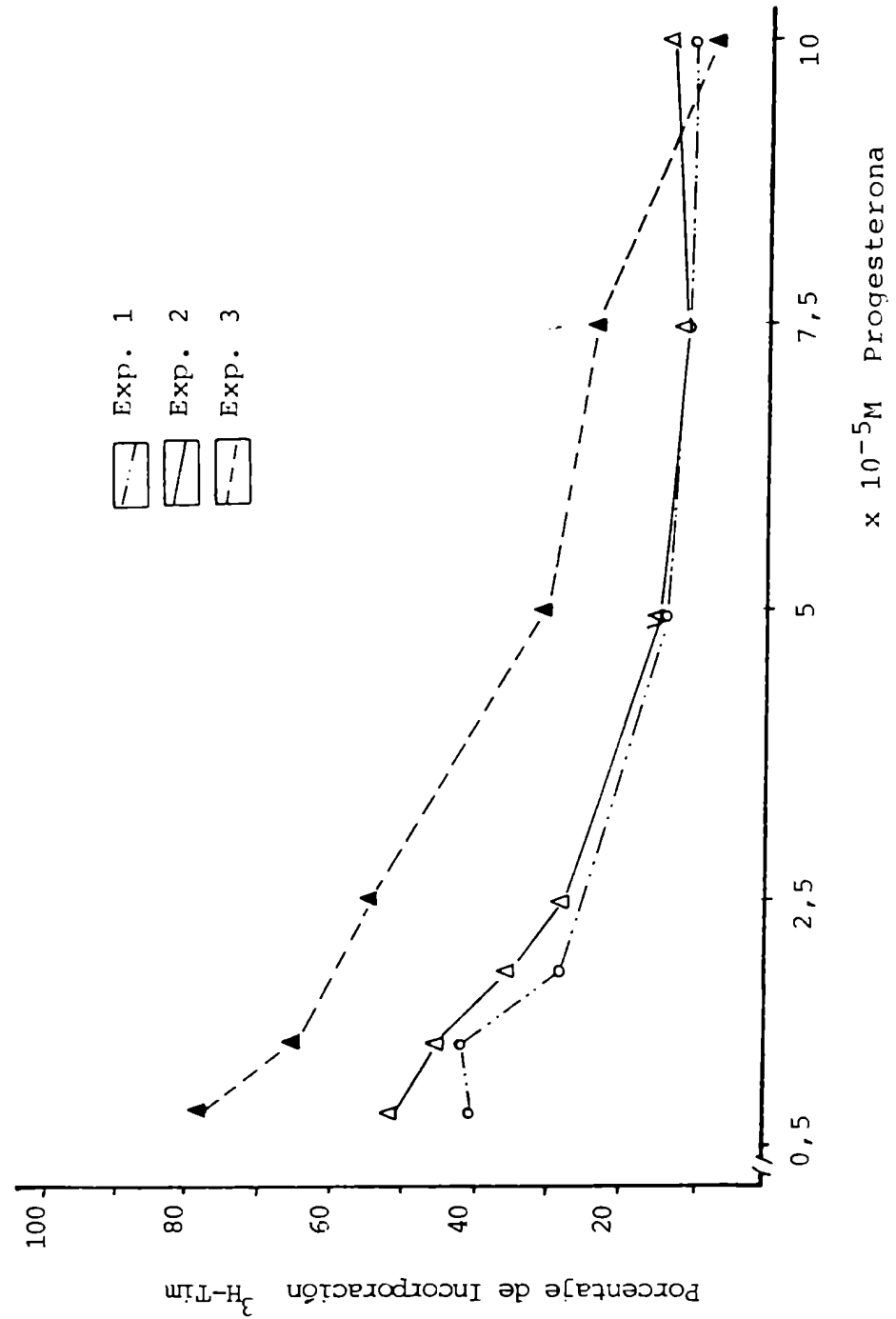
TABLA 21

EFFECTO DE LA PROGESTERONA (P) SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE CELULAS HELA. INCORPORACION DE ^3H -TIM (CPM) Y PORCENTAJE DE INCORPORACION CON RESPECTO A CONTROLES SIN TRATAR

Concentración de P x 10^{-5} M	Exp. 1		Exp. 2		Exp. 3	
	CPM *	%	CPM	%	CPM	%
0,88	5317 \pm 132	39	5603 \pm 547	77	10766 \pm 1073	51
1,75	5551 \pm 223	41	4715 \pm 527	65	9599 \pm 350	45
2,6	-		-		7210 \pm 570	34
3,5	3710 \pm 198	27	3917 \pm 164	54	5729 \pm 349	27
7	1867 \pm 94	14	2208 \pm 162	31	3114 \pm 220	15
10,5	1550 \pm 46	12	1748 \pm 102	24	2487 \pm 80	11
14	1493 \pm 122	11	463 \pm 37	6	3007 \pm 115	14
17,5	-		341 \pm 23	5	-	
21	1653 \pm 93	12	-		-	
Etanol %	8686 \pm 299		5987 \pm 416		29800 \pm 1375	
Medio	13515 \pm 348		7250 \pm 391		21237 \pm 656	

* $\bar{X} \pm \text{ES}$

Figura 15: Efecto de la progesterona sobre el crecimiento in vitro de células HELA.. Porcentaje de Incorporación con respecto a controles sin tratar



traciones crecientes de progesterona. El rango de inhibición fue similar a las otras células estudiadas y a igual que las células WISH éstas son un poco menos sensibles que los fibroblastos en las concentraciones más altas.

Conclusión

Como se observa en la Tabla 22 y en la Figura 16, la progesterona inhibió el crecimiento de fibroblastos normales y tumorales murinos así como también de células epiteliales en concentraciones por encima de $4 \times 10^{-6} \text{M}$. A pesar que el patrón de inhibición fue similar, en las concentraciones más altas, tanto los fibroblastos embrionarios como los tumorales fueron un poco más sensibles que las células WISH y HELA.

2. Efecto citolítico de la progesterona

Se midió el efecto citolítico de la progesterona marcando las células con ^{51}Cr y midiendo el isótopo radioactivo liberado al sobrenadante después de la incubación con concentraciones crecientes de la hormona.

a- Fibroblastos embrionarios

En la Tabla 23 y en la Figura 17 se observan los resultados obtenidos después de incubar fibroblastos embrionarios, marcados con ^{51}Cr , con concentraciones crecientes de progesterona durante 3 horas. En concentraciones menores de 10^{-4}M la liberación de ^{51}Cr fue similar o menor que la liberación espontánea de las células del grupo control; en concentraciones mayores de 10^{-4}M se observa que la cantidad de isótopo liberado al sobrenadante fue significativamente mayor que en los controles, o sea que se comienza a visualizar el efecto citotóxico de la hormona. Las concentraciones de etanol utilizadas como diluyente de la progesterona no son citotóxicas ya que la liberación de ^{51}Cr al sobrenadante es igual

TABLA 22

EFFECTO DE LA PROGESTERONA (P) SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS Y TUMORALES MURINOS Y DE LAS LINEAS CELULARES WISH Y HELA. PORCENTAJE DE ^3H -TIM CON RESPECTO A LOS CONTROLES SIN TRATAR

	I	II	III	IV
Concentración de P x 10^{-5} M	Fibroblastos embrionarios %	Fibroblastos tumoraes %	WISH %	HELA %
0,9	75 \pm 6 *	61 \pm 10	70 \pm 5	64 \pm 13
3,5	40 \pm 8	25 \pm 10	44 \pm 10	36 \pm 9
7	8 \pm 3 ^a	12 \pm 6	27 \pm 8	28 \pm 8
10	4 \pm 1	6 \pm 3	11 \pm 5	16 \pm 4

* $\bar{X} \pm \text{ES}$

a: $p < 0.05$ entre I y III y entre I y IV

Figura 16: Efecto de la progesterona sobre el crecimiento in vitro de fibroblastos embrionarios y tumorales murinos y de la línea celular WISH y HELA. Porcentaje de incorporación con respecto a controles sin tratar.

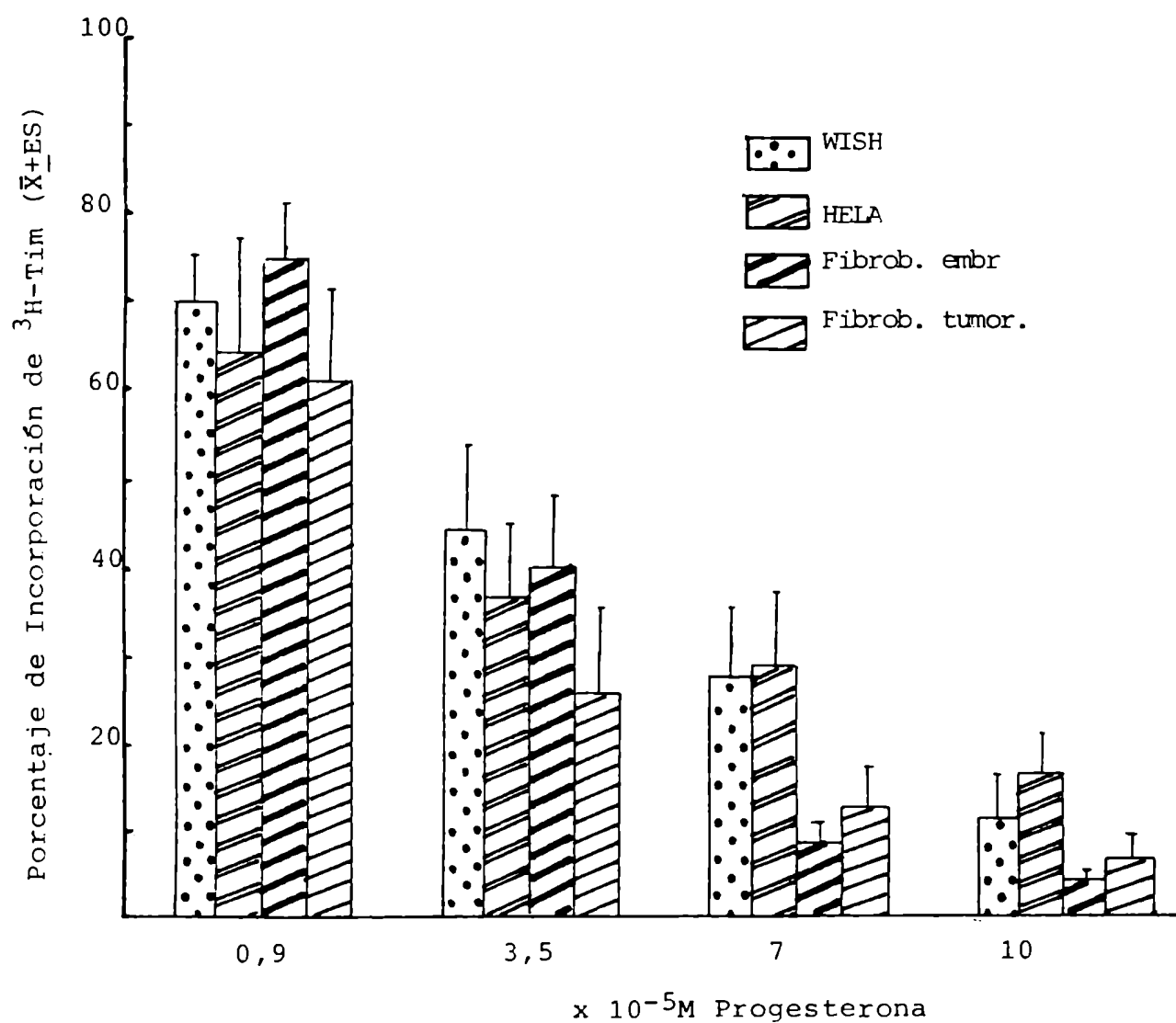


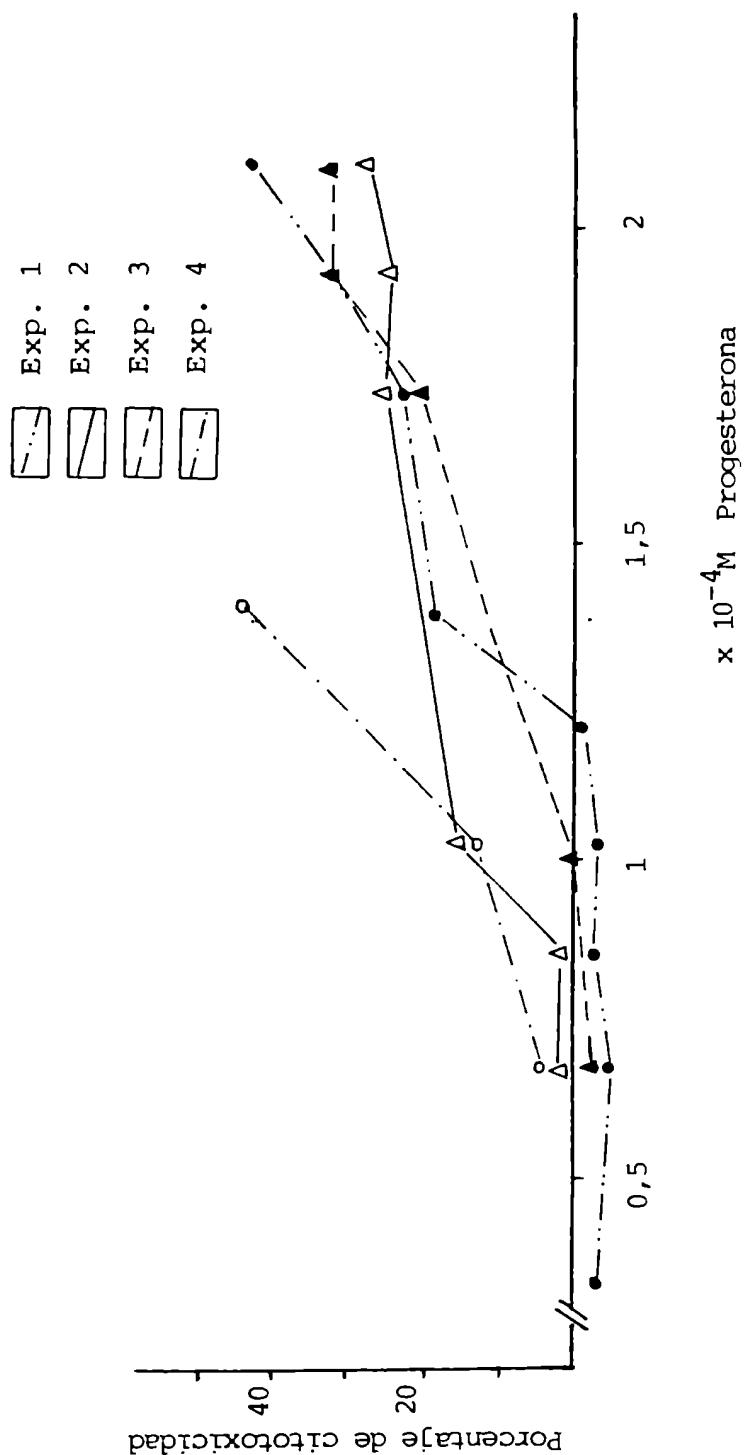
TABLA 23

EFFECTO CITOTOXICO DE LA PROGESTERONA (P). LIBERACION DE ^{51}Cr DE FIBROBLASTOS NORMALES MURINOS PREVIAMENTE MARCADOS DESPUES DE 3 HORAS DE INCUBACION CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE P (CPM) Y PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD CON RESPECTO A LA MAXIMA LIBERACION POSIBLE

Concentración de P x 10^{-4}M	Exp. 1 CPM * %	Exp. 2 CPM %	Exp. 3 CPM %	Exp. 4 CPM %
0,18	-	-	621+66 3	-
0,35	-	-	434+8 -3	-
0,53	-	-	401+53 -3	-
0,7	196+12 -3	436+52 2	350+27 -5	257+53 4
0,85	-	418+64 1	403+49 -3	-
1	237+23 -5	797+31 15	387+46 -4	413+48 13
1,2	-	-	443+62 -2	-
1,4	405+15 11	-	1113+132 17	897+33 42
1,6	-	1037+124 24	1600+185 31	-
1,8	536+43 20	-	1252+152 21	-
2	-	1017+45 23	1648+156 32	-
2,1	861+52 42	1082+81 31	1602+81 31	-
Liberación espontánea	241+13	380+51	523+21	190+27
Liberación máxima (Tritón 5%)	1720+102	3131+202	4015+388	1886+77
Etanol	205+25	386+18	563+23	298+92

* $\bar{X} \pm \text{ES}$

Figura 17: Efecto citotóxico de la progesterona. Liberación de ^{51}Cr de fibroblastos embrionarios murinos previamente marcados después de 3 horas de incubación con concentraciones crecientes de progesterona. Porcentaje de citotoxicidad con respecto a la máxima liberación.



que la liberación espontánea.

b- Fibroblastos tumorales

En la Tabla 24 y en la Figura 18 se observan los resultados que se obtuvieron al incubar fibroblastos tumorales murinos marcados con ^{51}Cr con concentraciones crecientes de progesterona durante 3 horas. Al igual que con los fibroblastos embrionarios, hubo un aumento del isótopo radioactivo liberado al sobrenadante en concentraciones mayores a $1 \times 10^{-4}\text{M}$ de la hormona manifestándose así su efecto citolítico.

c- Células WISH

En la Tabla 25 y en la Figura 19 B se observan los resultados obtenidos después de incubar durante tres horas células WISH marcadas con ^{51}Cr con concentraciones crecientes de hormona. No se observó ningún aumento del isótopo radioactivo en el sobrenadante ni con concentraciones de progesterona de $2.1 \times 10^{-4}\text{M}$. (No se pudieron probar concentraciones más altas por problemas de solubilidad). Incluso la cantidad de ^{51}Cr liberada al sobrenadante en casi todos los casos fue menor que la liberación espontánea como si la hormona tuviera un efecto protector sobre la membrana; es por eso que todos los valores de porcentaje de citotoxicidad dan negativos.

d- Células HELA

En la Tabla 26 y en la Figura 19A se observan los resultados que se obtuvieron después de incubar durante tres horas células HELA marcadas con ^{51}Cr con concentraciones crecientes de Progesterona. Al igual que en la otra línea epitelial no se observó ningún efecto citolítico de la hormona, ya que nuevamente la cantidad de isótopo liberada al sobrenadante fue menor en los grupos tratados que en el control manifes-

TABLA 24

EFFECTO CITOTOXICO DE LA PROGESTERONA (P).LIBERACION DE ^{51}Cr
DE FIBROBLASTOS TUMORALES MURINOS PREVIAMENTE MARCADOS
DESPUES DE 3 HORAS DE INCUBACION CON P (CPM) Y PORCENTAJE
DE CITOTOXICIDAD CON RESPECTO A LA MAXIMA LIBERACION POSIBLE

Concentración de P x 10^{-4} M	Exp. 1 CPM *	%	Exp. 2 CPM	%	Exp. 3 CPM	%
0,35					529 \pm 45	1
0,7	344 \pm 65	16	346 \pm 31	10	573 \pm 70	1
1	108 \pm 52	1	314 \pm 45	8	653 \pm 35	13
1,4	327 \pm 72	15	340 \pm 54	9	1028 \pm 153	47
1,75	484 \pm 53	25	558 \pm 65	22	1277 \pm 134	49
2,1	650 \pm 84	36	-		-	
Liberación espontánea	88 \pm 37		185 \pm 23		516 \pm 46	
Etanol %	-		274 \pm 19		517 \pm 54	
Liberación máxima (Tritón 5%)	1664 \pm 109		1859 \pm 90		1605 \pm 96	

* $\bar{X} \pm \text{ES}$

Figura 18: Efecto citotoxico de la progesterona. Liberación de ^{51}Cr de fibroblastos tumorales murinos previamente marcados después de 3 horas de incubación con progesterona. Porcentaje de citotoxicidad con respecto a la máxima liberación.

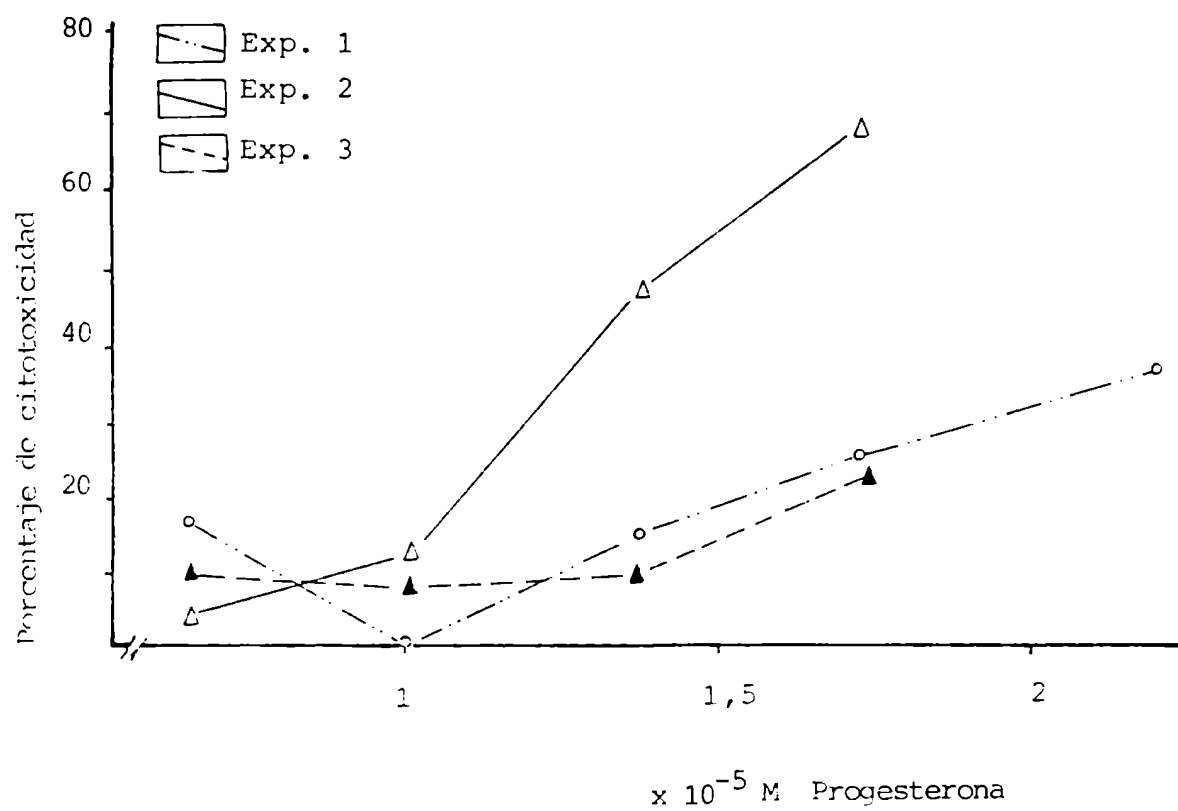


TABLA 25

LIBERACION DE ^{51}Cr DE CELULAS WISH PREVIAMENTE MARCADAS
DESPUES DE 3 HORAS DE INCUBACION CON PROGESTERONA (CPM)
Y PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD CON RESPECTO A LA MAXIMA
LIBERACION POSIBLE

Concentración de P x 10^{-4} M	Exp. 1 CPM* %	Exp. 2 CPM %	Exp. 3 CPM %
0,7	973 \pm 69 -6	1268 \pm 87 -2	586 \pm 24 -6
1	610 \pm 13 -12	1351 \pm 118 -2	567 \pm 26 -6
1,4	656 \pm 51 -12	1375 \pm 64 -6	547 \pm 25 -6
1,7	913 \pm 123 -7	1032 \pm 61 -6	531 \pm 34 -7
2,1	784 \pm 62 -9	1147 \pm 64 -4	585 \pm 40 -6
Liberación espontanea	1334 \pm 147	1495 \pm 44	1037 \pm 112
Etanol %	1129 \pm 199	1770 \pm 155	768 \pm 38
Liberación máxima (Tritón 5%)	7070 \pm 452	9559 \pm 777	8188 \pm 242

* $\bar{X} \pm \text{ES}$

Figura 19: Liberación de ^{51}Cr de células Hela (A) y células Wish (B) previamente marcadas después de 3 horas de incubación con progesterona. Porcentaje de citotoxicidad con respecto a la máxima liberación

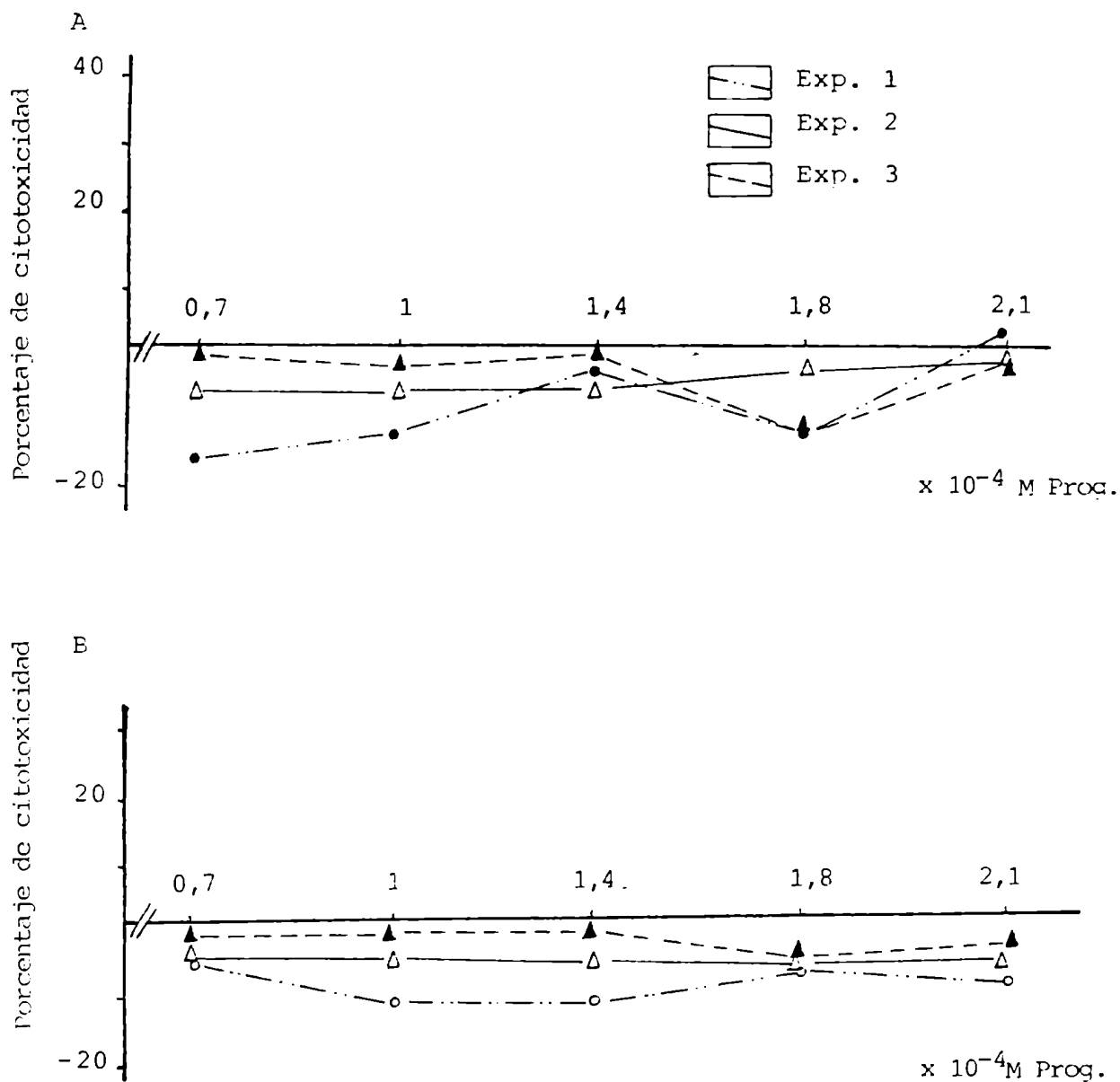


TABLA 26

LIBERACION DE ^{51}Cr DE CELULAS HELA PREVIAMENTE MARCADAS
DESPUES DE 3 HORAS DE INCUBACION CON PROGESTERONA (CPM)
Y PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD CON RESPECTO A LA MAXIMA
LIBERACION POSIBLE

Concentración de P x 10^{-4} M	Exp. 1 CPM *	1 %	Exp. 2 CPM %	2 %	Exp. 3 CPM %	3 %
0,7	786 ± 115	-17	814 ± 67	-1	486 ± 47	-6
1,05	982 ± 139	-13	631 ± 41	-3	485 ± 40	-6
1,4	1549 ± 105	-3	1010 ± 56	-1	413 ± 17	-6
1,75	1046 ± 135	-12	706 ± 59	-12	799 ± 126	-2
1,4	1875 ± 138		766 ± 67	-2	800 ± 23	-2
Liberación espontánea	1691 ± 341		938 ± 62		984 ± 52	
Etanol %	1367 ± 107					
Liberación máxima (Tritón 5%)	7158 ± 189		10347 ± 202		9654 ± 895	

* $\bar{X} \pm \text{ES}$

tándose nuevamente este efecto "protector".

Conclusión

La "ruptura celular" medida por liberación de ^{51}Cr fue marcadamente diferente en células de estirpe fibroblástica y epitelial. Tanto las células WISH como HELA no fueron afectadas por concentraciones de hormona que fueron citolíticas tanto para fibroblastos normales como para tumorales. (Tabla 27 y Figura 20)

3. Visualización del efecto de la progesterona sobre células en cultivo. Estudios de microscopía óptica

El examen microscópico de las células en cultivo reveló la existencia de importantes alteraciones morfológicas en los cultivos de fibroblastos tanto normales como tumorales después de 24-48 horas de incubación con progesterona $1.4 \times 10^{-4}\text{M}$: Por ejemplo, condensación citoplasmática con vacuolización progresiva y picnosis nuclear (Fig27). La morfología de las células epiteliales no fue afectada en estas condiciones pero el número de mitosis por campo fue significativamente más bajo en las células expuestas a progesterona que en los controles (0.24 y 2.45 respectivamente). Estos resultados de microscopía óptica confirman los resultados observados previamente. (Ver Figuras 21-28)

II. EFECTO DEL MPA SOBRE EL CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS Y TUMORALES MURINOS Y DE CELULAS WISH (Incorporación de ^3H -Tim. 24 horas de incubación)

a- Fibroblastos embrionarios

En la Tabla28 y en la Figura29 se observan los resultados que se obtuvieron después de incubar los fibroblastos

TABLA 27

EFFECTO DE LA PROGESTERONA (P) SOBRE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS Y TUMORALES MURINOS Y CELULAS. PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD

	I	II	III	IV
Concentración de P x 10 ⁻⁴ M	Fibroblastos embrionarios %	Fibroblastos tumoraes %	WISH %	HELA %
0,7	-0,5 ± 2 ^{a *}	10 ± 3	-4 ± 1	-8 ± 4
1	4,8 ± 5	7 ± 3 ^b	-7 ± 3	-7 ± 3
1,4	23 ± 9,5 ^c	24 ± 11	-7 ± 3	-3 ± 1,4
1,8 - 2,1	35 ± 3 ^d	39 ± 15	-7 ± 0,3	-9 ± 3,3

a: p < 0.05 entre I y II, entre II y III y entre II y IV

b: p < 0.05 entre II y III y entre II y IV

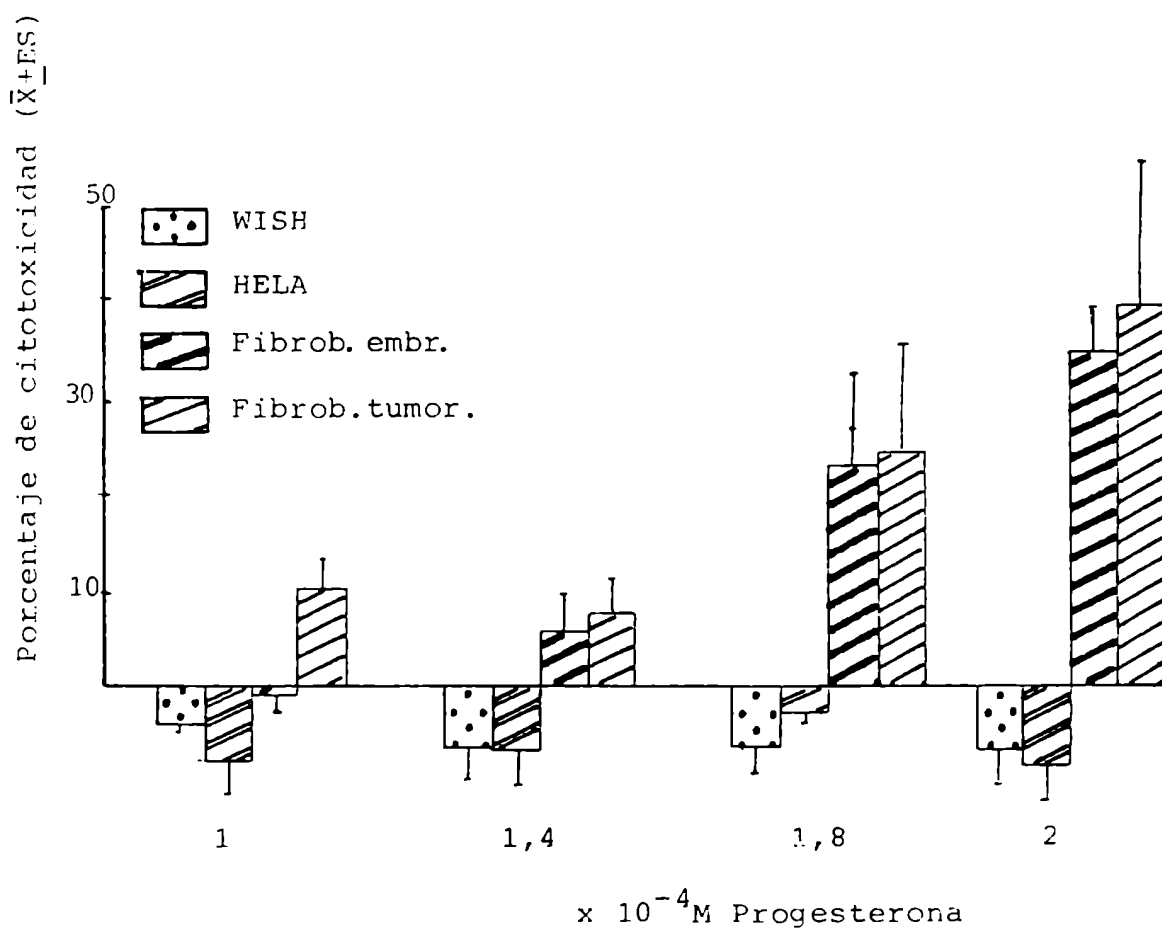
c: p < 0.05 entre I y III y entre I y IV

d: p < 0.01 entre I y III y entre I y IV

p < 0.05 entre II y III y entre II y IV

*: $\bar{X} \pm ES$

Figura 20: Efecto de la progesterona sobre fibroblastos embrionarios y tumorales murinos y células WISH y HELA. Porcentaje de citotoxicidad



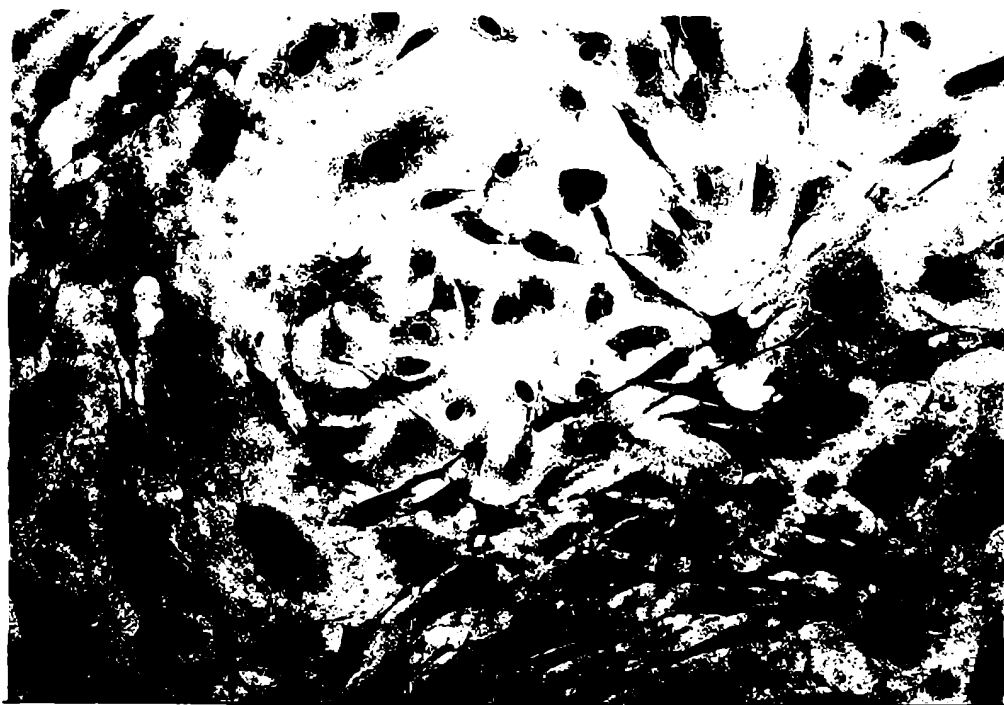


Figura 21: Cultivo de fibroblastos tumorales (Hematoxilina-eosina 200 X)

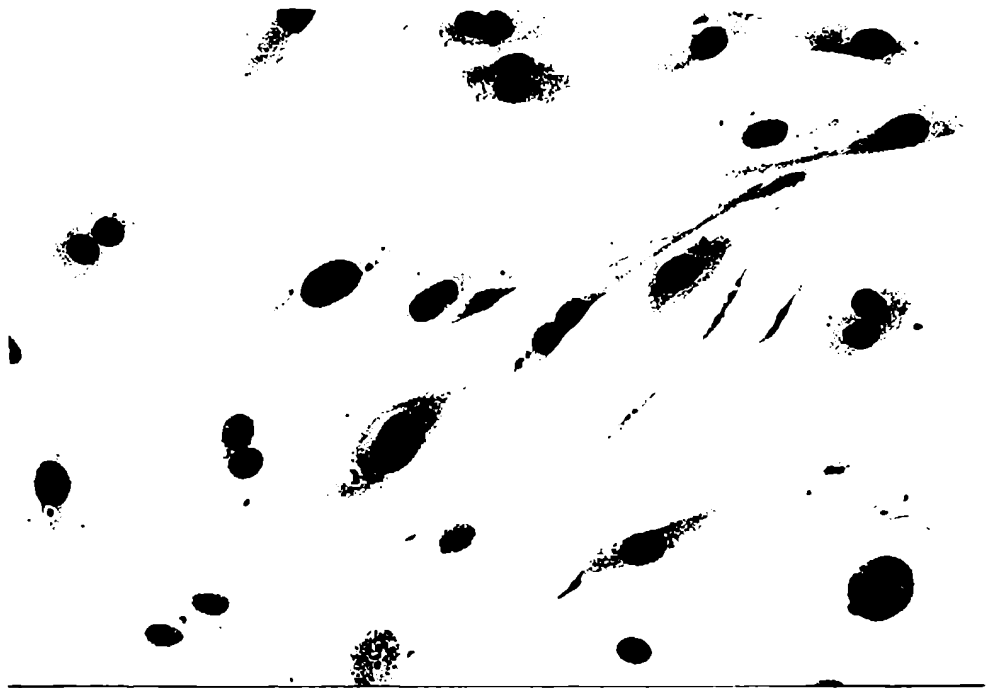


Figura 22: Cultivo de fibroblastos tumorales (Hematoxilina-eosina 312 X)

Figura 23: Cultivo de fibroblastos tumorales (Hematoxilina-eosina 1250X)



Figura 24: Cultivo de fibroblastos tumorales incubados durante 24 horas con progesterona $1,4 \times 10^{-4}$ M. Obsérvese la condensación de las prolongaciones citoplasmáticas. (Hematoxilina-eosina 200 X)



Figura 25: Cultivo de fibroblastos tumorales tratados con progesterona $1,4 \times 10^{-4}$ M durante 24 horas (hematoxilina-eosina 312X)

Figura 26: Cultivo de fibroblastos tumorales tratados con progesterona $1,4 \times 10^{-4}$ M durante 24 horas. Obsérvese la marcada vacuolización citoplasmática (Hematoxilina-eosina 1250X)

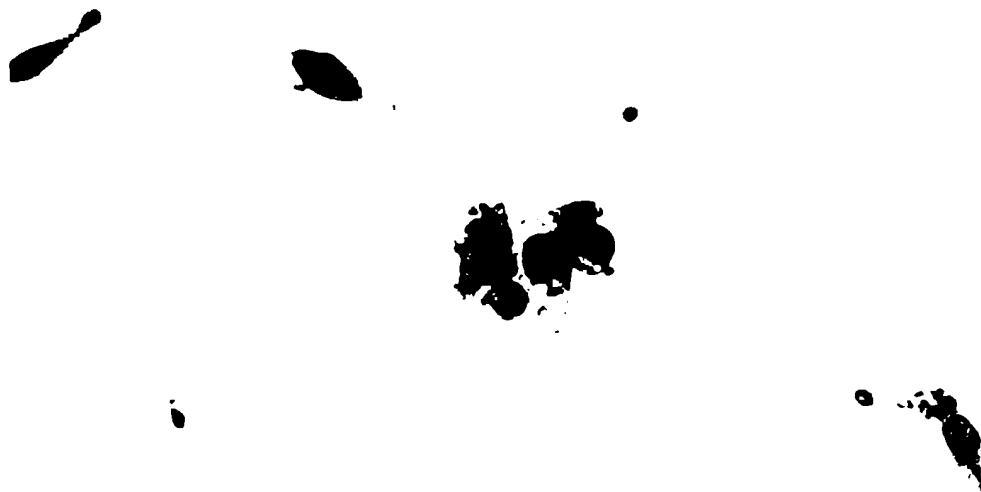


Figura 27: Cultivo de fibroblastos tumorales tratados con progesterona $1,4 \times 10^{-4}$ M durante 48 horas. Obsérvese la marcada vacuolización citoplasmática (Hematoxilina-eosin 500X)

Figura 28: Cultivo de fibroblastos tumorales tratados con progesterona $1,4 \times 10^{-4}$ M durante 48 horas. Obsérvese la condensación irregular de la cromatina (Hematoxilina-eosina 1250X)

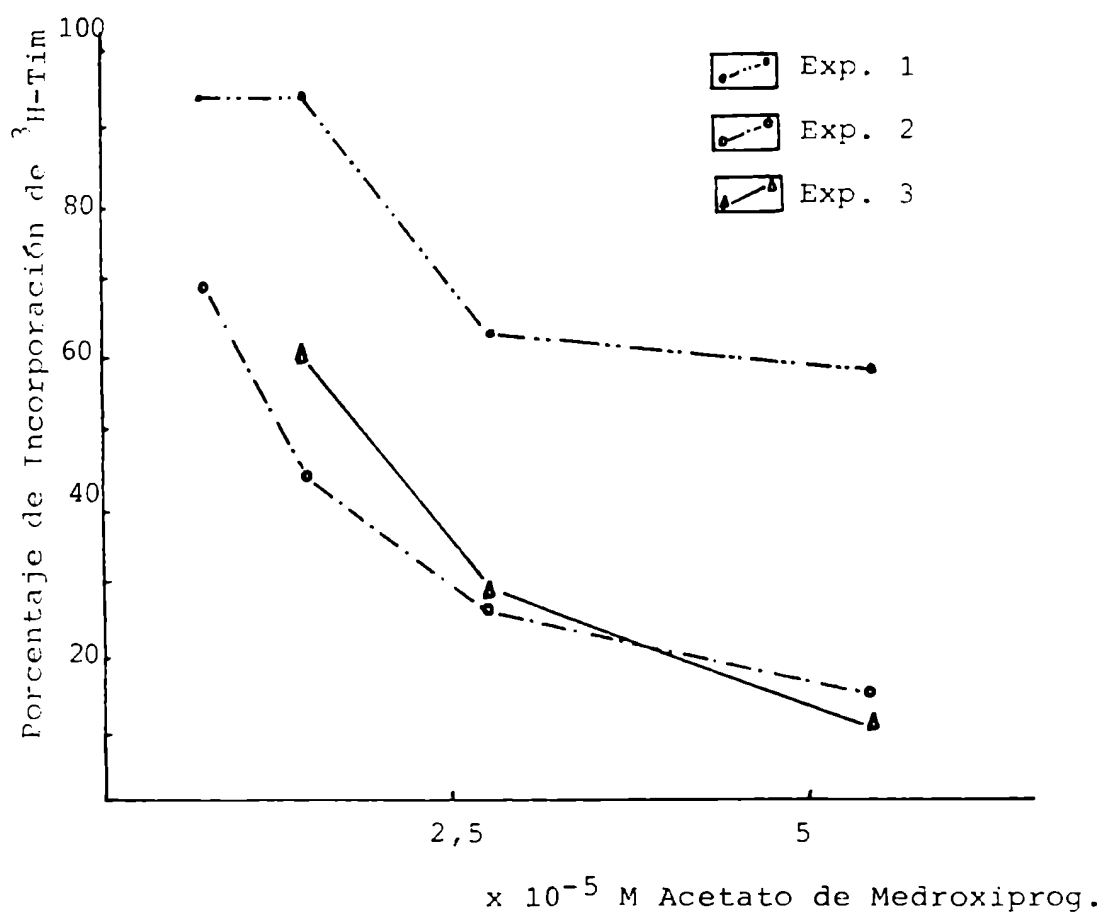
TABLA 2 8

EFFECTO DEL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA) SOBRE EL
 CRECIMIENTO IN VITRO DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS.
 INCORPORACION DE ^3H -TIM (CPM) Y PORCENTAJE DE INCORPORACION
 CON RESPECTO A CONTROLES SIN TRATAR

Concentración de MPA x 10^{-5}M	Exp. 1		Exp. 2		Exp. 3	
	CPM *	%	CPM	%	CPM	%
0,35						
0,69	18854 \pm 1118	94	1788 \pm 577	69	1621 \pm 170	41
1,4	19002 \pm 1122	95	1148 \pm 114	44	2353 \pm 234	60
2,8	12578 \pm 722	63	1302 \pm 257	26	1089 \pm 170	28
4,2	10545 \pm 930	53	-		-	
5,5	11536 \pm 1140	58	360 \pm 33	14	359 \pm 83	9
Medio	20019 \pm 1198		2593 \pm 566		3951 \pm 569	

* $\bar{X} \pm \text{ES}$

Figura 29: Efecto del acetato de medroxiprogesterona (MPA) sobre el crecimiento in vitro de fibroblastos embrionarios. Porcentaje de incorporación de ^3H -Tim con respecto a controles sin tratar



embrionarios con concentraciones crecientes de MPA. Se observa que los cultivos tratados con MPA incorporan menos timidina que los controles. La inhibición a la concentración $5 \times 10^{-5} \text{M}$ no es total y no se puede ensayar concentraciones más altas por la falta de solubilidad de la hormona.

b- Fibroblastos tumorales

Como se observa en la Tabla 29 la incorporación de ^3H -Tim por los fibroblastos tumorales es mucho menor en los tratados con MPA que en los controles. Al igual que en los fibroblastos embrionarios la inhibición no es total a la máxima concentración que se puede obtener (Figura 30).

c- Células WISH

Como se observa en la Tabla 30 a diferencia de lo que ocurría con los fibroblastos, no se observa menor incorporación de timidina en los tratados con MPA que en los controles (Fig 31)

Conclusión

Como se observa en la Tabla 31 y en la Figura 32 el MPA inhibió el crecimiento de fibroblastos normales y tumorales en concentraciones de $0,7 \times 10^{-5}$ a $5 \times 10^{-5} \text{M}$ obteniendo hasta 27-31 % de inhibición comparado con controles sin tratar, en cambio no inhibió la proliferación de las células WISH en las mismas condiciones.

III. COMPARACION DEL EFECTO DE LA PROGESTERONA, CORTISOL Y DEXAMETASONA SOBRE LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS

Para comprobar si el efecto inhibitorio obtenido se debía a la alta concentración de esteroide se comparó el efecto de

TABLA 2 9

EFFECTO DEL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA) SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE FIBROBLASTOS TUMORALES. INCORPORACION DE 3 H-TIM (CPM) Y PORCENTAJE DE INCORPORACION CON RESPECTO A CONTROLES SIN TRATAR

Concentración de MPA x 10 ⁻⁵ M	Exp. 1 CPM *	%	Exp. 2 CPM	%	Exp. 3 CPM	%	Exp. 4 CPM	%
0,69								
1,4	27007 ± 1335	78	6003 ± 354	65	77627 ± 2522	72	29633 ± 2283	72
2,8	19742 ± 2976	57	1970 ± 233	21	67933 ± 8406	62	23188 ± 451	42
3,9	-		-		53187 ± 2061	49	22277 ± 867	41
5,5	6957 ± 526	20	2250 ± 231	24	43770 ± 2756	40	21041 ± 2107	38
6,9	-		-		39315 ± 1922	36	19404 ± 3043	35
DMS-Et (1:1) %	34535 ± 974		-		-		56013 ± 2244	
Control	-		9202 ± 778		108160 ± 4228		54931 ± 5420	

* $\bar{X} \pm ES$

Figura 30 : Efecto del acetato de medroxiprogesterona sobre el crecimiento in vitro de fibroblastos tumorales. Porcentaje de incorporación de ^3H -Tim con respecto a controles sin tratar

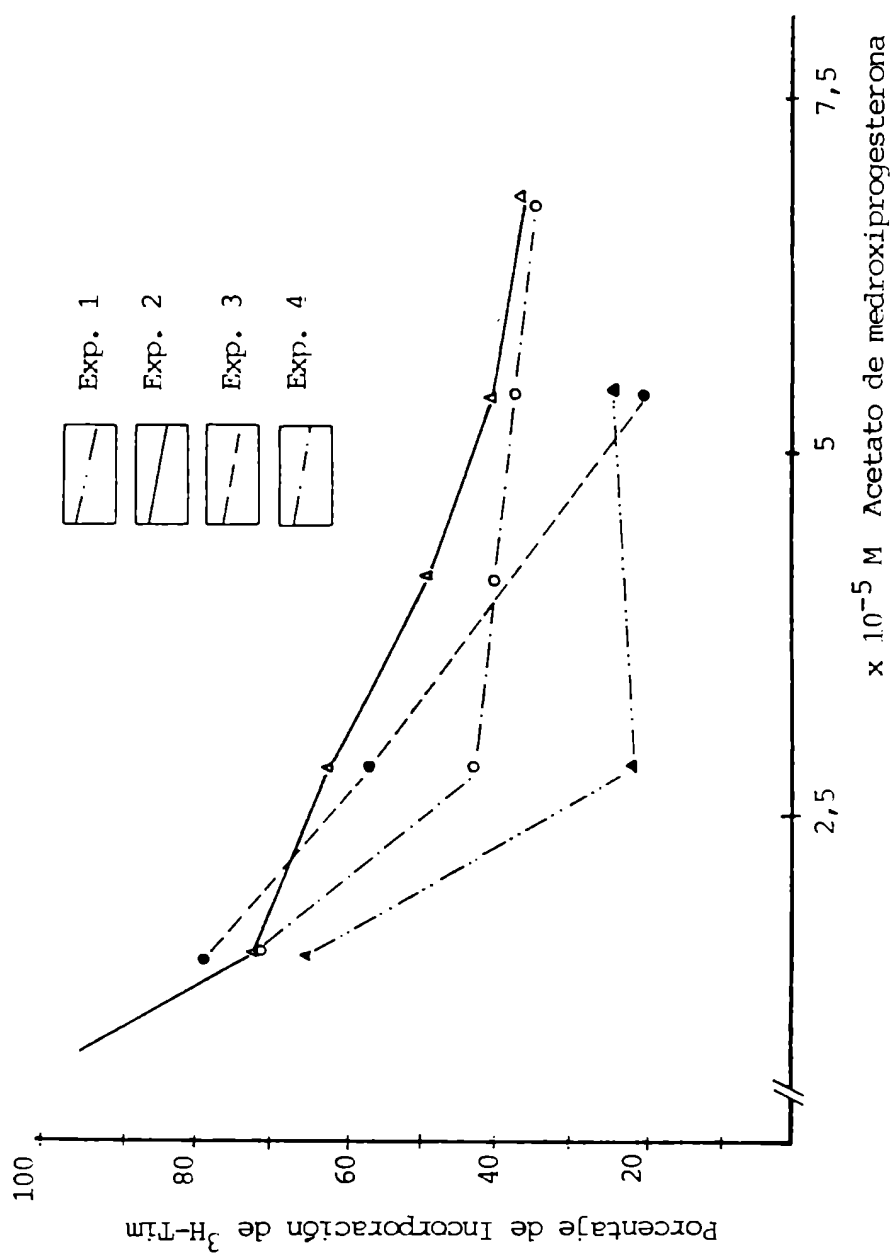


TABLA 30

EFFECTO DEL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA) SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE CELULAS WISH. INCORPORACION DE ^3H -TIM (CPM) Y PORCENTAJE DE INCORPORACION CON RESPECTO A CONTROLES SIN TRATAR

Concentración de MPA x 10^{-5}M	Exp. 1 CPM *	%	Exp. 2 CPM	%	Exp. 3 CPM	%
0,35	10294 \pm 649	84	-		-	
0,69	10616 \pm 339	86	-		-	
1,4	10591 \pm 440	86	-		7467 \pm 183	79
2,8	11165 \pm 833	91	11203 \pm 688	93	6570 \pm 183	69
4,2	8807 \pm 311	72	10190 \pm 254	84	9285 \pm 288	98
5,5	8846 \pm 165	72	10898 \pm 594	90	8932 \pm 312	94
6,9	9702 \pm 595	79	10450 \pm 284	86	8630 \pm 482	91
DMS-Et (1:1) %	11421 \pm 724		11868 \pm 875		9085 \pm 415	
Control	12291 \pm 964		12116 \pm 217		9568 \pm 590	

* $\bar{X} \pm \text{ES}$

Figura 31: Efecto del acetato de medroxiprogesterona sobre el crecimiento in vitro de células WISH. Porcentaje de incorporación con respecto a controles sin tratar

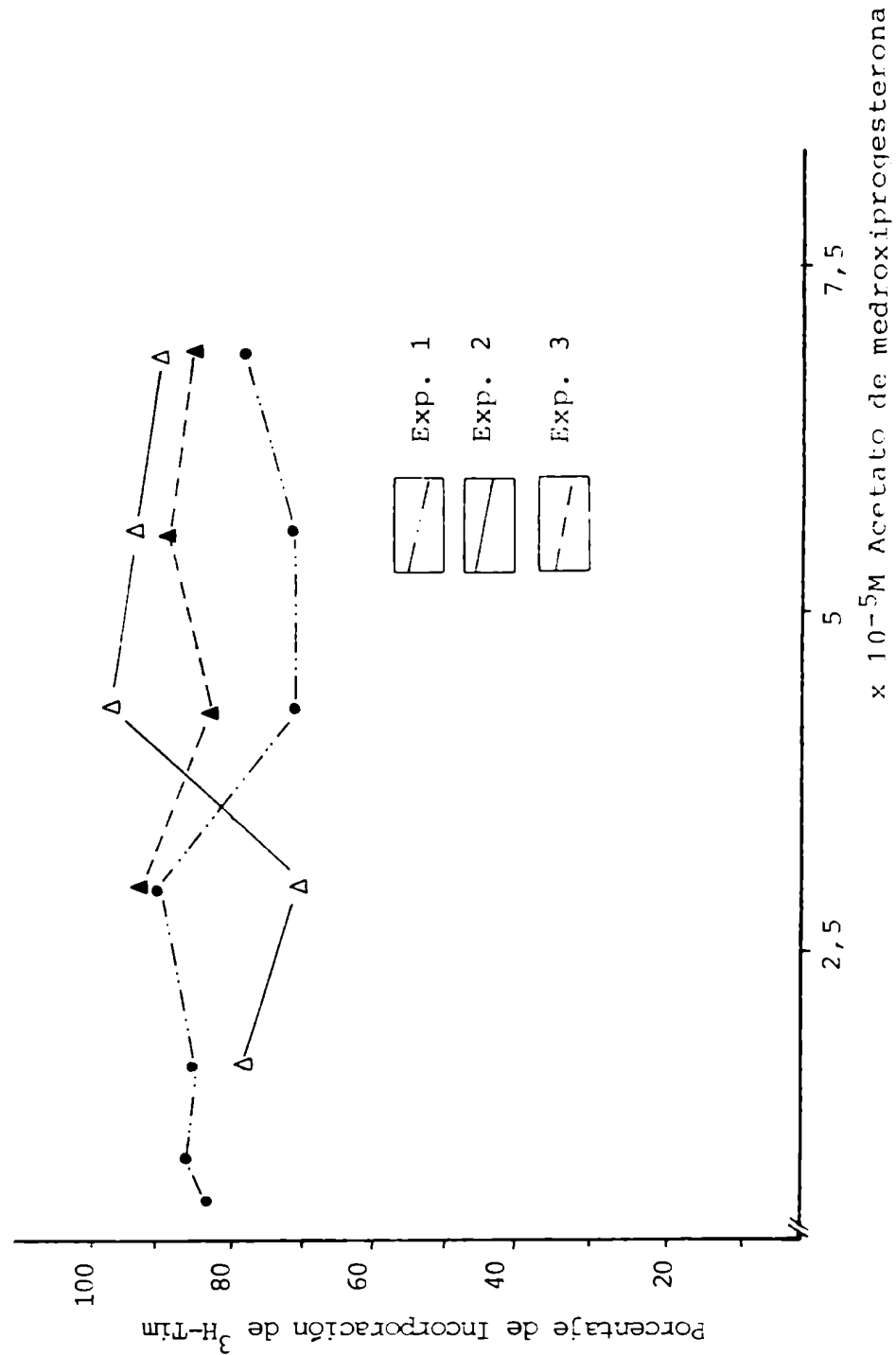


TABLA 31

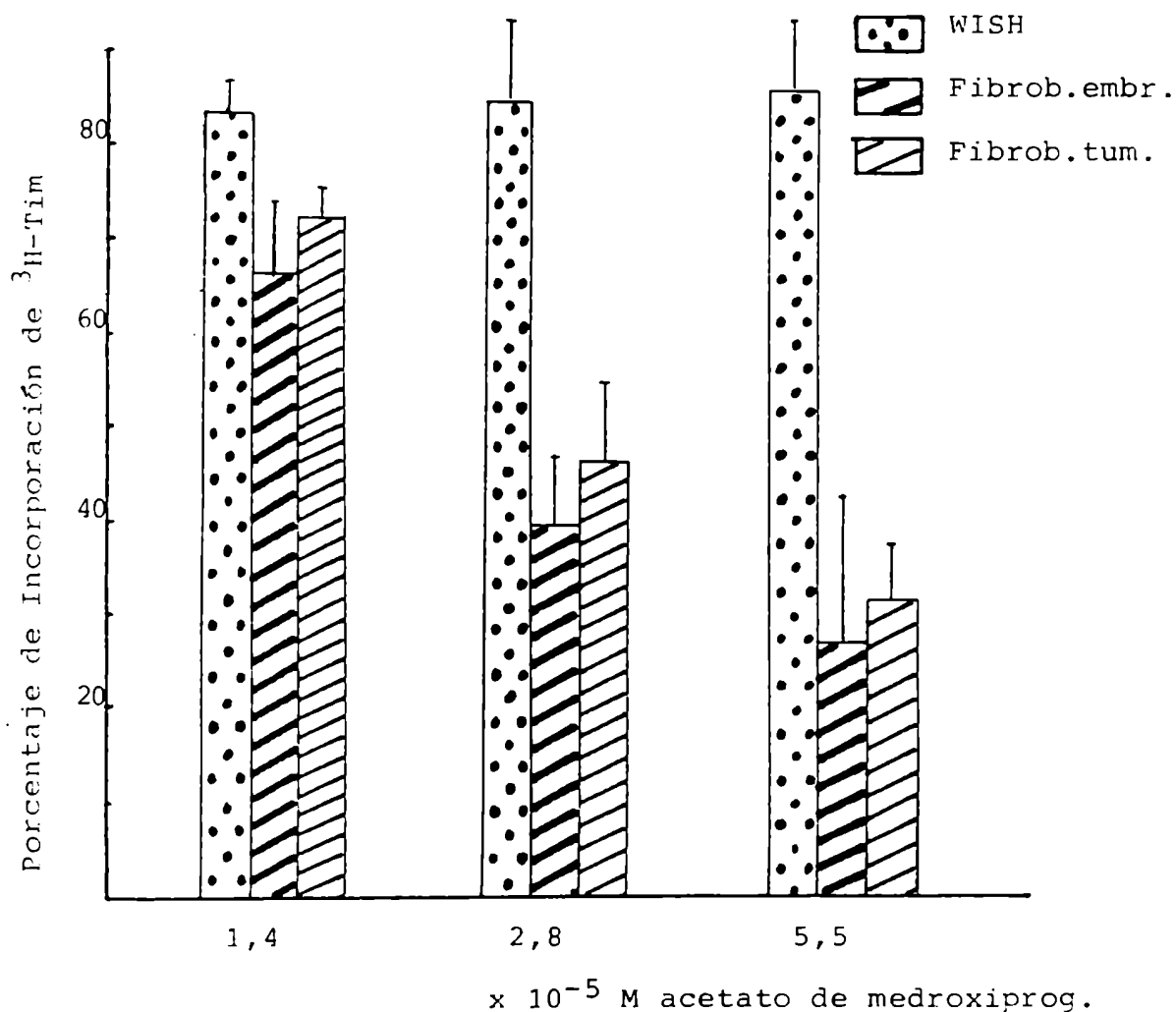
EFEECTO DEL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA) SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS Y TUMORALES MURINOS Y DE LA LINEA CELULAR WISH. PORCENTAJE DE ^3H -TIM CON RESPECTO A CONTROLES SIN TRATAR

	I	II	III
Concentración de MPA $\times 10^{-5}\text{M}$	Fibroblastos embrionarios %	Fibroblastos tumORAles %	WISH %
0,7	68 \pm 15*	-	-
1,4	66 \pm 15	72 \pm 3	83 \pm 4
2,8	39 \pm 12 ^a	46 \pm 9	84 \pm 8
5,5	27 \pm 15 ^b	31 \pm 6	85 \pm 7

* -

X \pm ES n= 3a: $p < 0.05$ entre I y III y entre II y IIIb: $p < 0.05$ entre I y III y $p < 0.01$ entre II y III

Figura 32: Efecto del acetato de medroxiprogesterona (MPA) sobre el crecimiento in vitro de fibroblastos embrionarios y tumorales murinos y de la línea celular WISH. Porcentaje de incorporación de ^3H -Tim con respecto a controles sin tratar



la progesterona con otros esteroides: la dexametasona y el cortisol. Como se observa en la Tabla 32 la inhibición de la proliferación fue mucho más acentuada con progesterona que con los otros dos esteroides.

Se puede concluir que en experimentos in vitro, la progesterona y el MPA fueron capaces de inhibir la proliferación de fibroblastos. Esta inhibición si bien se manifestó en concentraciones farmacológicas tiene cierto grado de especificidad ya que el cortisol y la dexametasona no fueron capaces de producirla en las mismas condiciones experimentales. A pesar de que las células epiteliales también fueron inhibidas con progesterona, los fibroblastos mostraron ser más sensibles en las concentraciones más altas. Esta mayor sensibilidad se vio más acentuada cuando se analizó el poder citolítico de la hormona, ya que sólo los fibroblastos fueron dañadas con concentraciones altas de la misma. Si bien no se hicieron muchos estudios para dilucidar el mecanismo de acción, parecería que no está mediado por receptores ya que las concentraciones de esteroide son altas, el efecto es rápido y reversible.

TABLA 32

COMPARACION DEL EFECTO DE LA PROGESTERONA, CORTISOL Y DEXAMETASONA SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS MURINOS DESPUES DE 24 HORAS DE INCUBACION INCORPORACION DE ^3H -TIM (CPM) Y PORCENTAJE CON RESPECTO AL CONTROL SIN TRATAR (19265 ± 615 CPM)

	I		II		III	
Concentración	Cortisol	%	dexametasona	%	progesterona	%
10^{-8} M	$22169 \pm 458^*$	115	16660 ± 302	75	17683 ± 502	92
10^{-7} M	20029 ± 831	104	19777 ± 760	102	19743 ± 990	102
10^{-6} M	21278 ± 708^a		21395 ± 783	111	16342 ± 363	85
10^{-5} M	22844 ± 1826^a	118	18335 ± 718	95	9498 ± 341	49
10^{-4} M	15026 ± 457^a	78	12646 ± 884	66	204 ± 13	2

* $\bar{X} \pm \text{ES}$

a: $p < 0.001$ entre I y III y entre II y III

D I S C U S S I O N

El objetivo de este trabajo de tesis ha sido investigar el efecto de la progesterona y del acetato de medroxiprogesterona (MPA) sobre fibroblastos neoplásicos de origen murino. Se evaluó este efecto, por un lado, sobre el crecimiento de un fibrosarcoma tanto in vivo como in vitro y por el otro sobre la inducción de sarcomas por tumorigénesis por cuerpo extraño.

Cuando 50 mg de MPA fueron inculados junto con el trasplante subcutáneo de un fibrosarcoma singeneico (Px), se observó una disminución estadísticamente significativa de incidencia tumoral; más aún, los pocos animales en los cuales el tumor creció murieron mucho más tarde que los controles. Con el excipiente del MPA se obtuvo un efecto exacerbante del crecimiento del fibrosarcoma cuando éste fue inoculado mediante trócar; en cambio, cuando el inóculo tumoral se hizo mediante una suspensión celular, no hubo diferencia entre los controles con excipiente y con solución fisiológica. En los experimentos en los cuales se inoculó primero el tumor y luego, días más tarde, el MPA, se encontró sólo un retardo en la aparición de los tumores; estos resultados son difíciles de evaluar ya que el excipiente a veces ejerció el mismo efecto. Por ende, se puede concluir que este fibrosarcoma murino, una vez iniciado su desarrollo, no responde al tratamiento con progestágenos de la misma manera que los tumores desmoides de cobayo (1, 2, 9, 10) o que las fibromatosis humanas que responden satisfactoriamente al tratamiento con progesterona (4-7).

Con el fin de evaluar si el efecto inhibitorio del MPA observado era específico para el fibrosarcoma, se repitieron los experimentos utilizando dos tumores de otra estirpe histológica: una leucemia linfoide (LB) y un carcinoma indiferenciado (CFI). Con la leucemia se obtuvo una disminución de la incidencia tumoral similar a la que se obtuvo con el fibrosarcoma, mientras que con el carcinoma sólo se observó un retardo

en su crecimiento. Es interesante hacer notar que las células linfoides y los fibroblastos neoplásicos hayan respondido de una manera similar al tratamiento con MPA, ya que tanto los fibroblastos (13) como las células linfoides (143) son células blanco de los esteroides. En los experimentos in vitro también se pudo demostrar que los fibroblastos eran más sensibles que las células epiteliales a altas concentraciones de progesterona y de acetato de medroxiprogesterona (10^{-5} a 10^{-4} M). Teniendo en cuenta la similitud entre los resultados in vivo e in vitro, se puede postular que el MPA actúa directamente sobre las células tumorales. Gross y col (144) postularon que el MPA inhibe el factor angiogénico tumoral. Este factor sería liberado por las células tumorales e induciría la proliferación de los capilares siendo indispensable para el crecimiento tumoral ya que si el trasplante no se vasculariza no puede superar un tamaño de 3 mm^3 . Sin embargo, nuestros resultados no apoyan esta explicación ya que no se obtuvo una inhibición de crecimiento con el carcinoma.

Recientemente, Pavelic y col (145) demostraron que el MPA no alteraba el crecimiento de un fibrosarcoma que había sido inducido por metilcolantreno transplantado en ratones CBA. Sus experimentos difieren de los nuestros porque usaron dosis más bajas (1 mg dos veces por semana) y porque el tratamiento se comenzó un día después del inóculo tumoral. Por otra parte, Markham y col (146) obtuvieron un aumento en la incidencia de tumores después de una única inyección intraperitoneal de 5 mg de progesterona un día antes del inóculo con Virus de Sarcoma de Moloney. Tanto los tumores virales (147) como los inducidos por metilcolantreno (148) son fuertemente inmunogénicos lo que hace difícil discernir entre un efecto directo de la hormona sobre las células tumorales y el efecto inmunosupresor que tienen los progestágenos (22). En nuestros experimentos, este

último efecto del MPA sería irrelevante debido a que se ha demostrado que los tres tumores utilizados no son inmunogénicos (149).

Otro de los objetivos de esta tesis fue evaluar el efecto de la progesterona sobre el crecimiento in vitro del fibrosarcoma murino. Se evaluaron dos efectos: el citostático, o sea determinar si la hormona inhibía la proliferación de las células tumorales en cultivo, y el citolítico, es decir, si se producía una lisis de las células. Se encontró que la progesterona inhibía la proliferación de fibroblastos tumorales en cultivo, en concentraciones altas que oscilan entre $0.7 \times 10^{-5}M$ y $10^{-5}M$ y que la curva de inhibición era muy similar para los fibroblastos tumorales que para los fibroblastos normales. También se evaluó si el efecto inhibitorio observado era específico para fibroblastos. Se utilizaron dos líneas de estirpe epitelial, una normal (WISH) y la otra de origen neoplásico (HELA) y se comprobó que la progesterona también inhibía la proliferación de estas células; sin embargo, en las concentraciones más altas, los fibroblastos fueron un poco más sensibles que las células epiteliales. En todos estos experimentos se incubaron las células en cultivo junto con la hormona y con la timidina durante 24 horas. Se decidió evaluar si incubando la hormona con las células durante más tiempo, se podía obtener el mismo efecto inhibitorio a concentraciones más bajas de progesterona: se observó que la inhibición era similar después de 24 ó 72 horas de incubación con la hormona. También se estudió si el efecto inhibitorio era reversible, o sea que en un experimento, después de 48 horas de incubación con progesterona se cambió el medio de cultivo y se agregó medio sin hormona, comprobándose así que el efecto era reversible ya que el número de cuentas (cpm) aumentó significativamente. Se pudo confirmar este efecto citostático de la progesterona sobre las células en cultivo al observarse una disminución en el número de mitosis por campo, descartando así la

posibilidad de que altas concentraciones de progesterona hayan interferido con la penetración de ^3H -Tim en la célula, dando falsos datos de inhibición de crecimiento (130). Nuestros resultados coinciden con los de Hackney y col (150) quienes tratando de demostrar que la progesterona y el cortisol se combinan con el mismo receptor en fibroblastos de la línea L 929, demostraron también inhibición de crecimiento en el mismo rango de dosis que nosotros. Este rango de concentración es muy similar al usado por otros autores que observaron que la progesterona inhibía la proliferación de linfocitos inducida por antígenos (128), mitógenos (126-128) o células alogeneicas (129, 130). Esta concentración de progesterona si bien parece ser suprafarmacológica es la encontrada en placenta humana (22).

El acetato de medroxiprogesterona (MPA) es más insoluble que la progesterona; sólo se pudieron obtener soluciones hasta $7 \times 10^{-5} \text{M}$ ya que por encima de esta concentración se formaban cristales. Cuando se repitieron los experimentos de incorporación de ^3H -Tim utilizando MPA también se observó una inhibición de crecimiento celular similar a la obtenida con progesterona sin embargo, esta inhibición no fue total ya que no se pudieron alcanzar las concentraciones con las cuales se obtuvo una inhibición completa con progesterona. Lo que si llama la atención es que las células epiteliales (WISH) no se inhibieron con estas concentraciones de MPA. Los resultados obtenidos con fibroblastos embrionarios son discordantes. En los cultivos primarios de embriones, por más que los fibroblastos predominan, siempre hay algunas células epiteliales. Una posible explicación podría ser que en el experimento en el que se observó menor inhibición con la hormona, hubiera habido más células epiteliales que en los cultivos de los otros dos experimentos.

Así como se evaluó la especificidad de los progestagenos sobre distintos tipos celulares se determinó también la especificidad de la progesterona comparado con otros esteroides. Para ello se utilizaron cortisol y dexametasona; el primero es un

corticoide natural y el segundo uno sintético. Se comparó la incorporación de ^3H -Tim por fibroblastos embrionarios incubados durante 24 horas con concentraciones crecientes de progesterona, cortisol y dexametasona. Se observó que ninguno de los corticoides produjo una acentuada inhibición de crecimiento. Si bien se dice que los corticoides inhiben la proliferación de fibroblastos, el efecto comienza a visualizarse recién al tercer día de incubación. Este efecto es bien diferente al descrito para la progesterona ya que no es inmediato, no es reversible, se produce con concentraciones más baja de hormona (10^{-7}M) y estaría mediado por receptores (151, 152). Teniendo en cuenta que es conocido en diversos sistemas experimentales que la progesterona en alta concentración se combina con el receptor para glucocorticoides (42), se podría pensar que el mecanismo de acción de la progesterona en la inhibición de la proliferación de los fibroblastos involucra estos receptores; sin embargo, las diferencias señaladas hacen pensar que se trata de otro mecanismo. Stites y col (135) también han demostrado que la inhibición de la proliferación de linfocitos por progesterona y cortisol siguen caminos diferentes y tampoco creen que en este sistema la progesterona actúe por interacción con los receptores de glucocorticoides, sino que sugieren que ésta actuaría directamente sobre la membrana plasmática de las células interfiriendo con funciones celulares. Ya hemos mencionado anteriormente (Introducción) que existen algunos efectos de los esteroides que no estarían mediados por receptores, entre ellos, el efecto anestésico que tiene la progesterona en alta concentración, lo cual involucraría cambios en la membrana plasmática (153).

Para evaluar el efecto citolítico de la progesterona se utilizaron dos métodos: 1) marcación de las células con ^{51}Cr , incubación durante tres horas con la hormona y medición del

^{51}Cr liberado al sobrenadante y 2) observación de los cultivos por microscopía óptica. En el primer caso, el tiempo del ensayo no pudo ser más largo debido a la alta liberación espontánea de las células en cultivo. Se demostró que sólo los fibroblastos, tanto embrionarios como tumorales, se alteraban en presencia de alta concentración de progesterona. En el caso de las células epiteliales, se observó que las tratadas con la hormona tenían menor liberación espontánea que los controles por lo cual se obtienen datos negativos. Como ya se demostró que las células epiteliales tratadas con estas concentraciones de progesterona no se dividen, una posible explicación podría ser que la liberación espontánea de los controles se deba a que algunas células se encuentren en división, en cambio como las tratadas con la hormona no se dividen, liberan menos cromo que los controles. Las observaciones con microscopía óptica confirmaron los resultados anteriores; mientras que los fibroblastos tanto normales como tumorales presentaban alteraciones importantes, no se observó ningún tipo de daño celular en los cultivos de células epiteliales. El daño celular observado en cultivos de fibroblastos tratados 24 ó 48 horas con progesterona fue similar al observado por otros autores (13) después de incubar durante varios días fibroblastos con concentraciones de glucocorticoides del orden de 10^{-7}M . Los cambios consistieron en acortamiento de las prolongaciones citoplasmáticas, grandes vacuolizaciones y degeneración nuclear.

Al encontrar una inhibición del crecimiento de tumores trasplantables con AMP, pareció importante investigar el efecto de esta hormona sobre la inducción de tumores por cuerpo extraño, es decir sobre tumores que se producen como consecuencia de la implantación subcutánea de un cilindro de vidrio (140). Los resultados demostraron que cuando la hormona se inculaba en la vecindad del cilindro de vidrio había una disminución en la incidencia de sarcomas y en el ritmo de su aparición. Cuando el AMP se inculó en el flanco contralateral al cuerpo

extraño, la incidencia tumoral también resultó menor pero el ritmo de aparición de los tumores fue el mismo que en los controles. El tratamiento con MPA no produjo alteraciones histológicas de los tumores. El proceso que conduce a la tumorigénesis por cuerpo extraño ha sido discutido recientemente por Farber y Cameron (92). De acuerdo a Brand y col (101), involucraría múltiples etapas durante las cuales una célula preneoplásica se transformaría progresivamente en una célula neoplásica funcional; este cambio tendría lugar en la cápsula fibrosa que rodea al cuerpo extraño. Los cambios que tendrían lugar en los diferentes pasos no están delimitados; Brand (101) considera que un error espontáneo o mutación en la célula parental podría ser el primer paso hacia el desarrollo del cáncer. También considera que el sistema inmune no estaría involucrado ya que demostró que estos tumores no son inmunogénicos (98). Una comprensión de las consecuencias de la exposición a un cuerpo extraño usando modelos experimentales es importante como base para evaluar riesgos similares en el hombre. En los últimos años se ha observado un aumento significativo en la exposición humana a cuerpos extraños o polímeros plásticos, particularmente con el aumento del uso de implantes mamarios y otras prótesis, pero aún no se ha observado un aumento significativo de sarcomas asociados al cuerpo extraño (154). Muchos investigadores (91, 155) sugieren que el factor limitante con respecto a la experiencia en el hombre es el tiempo; en roedores, el tiempo de latencia de estos tumores es largo (101) y por lo tanto sugiere que en humanos todavía no ha transcurrido suficiente tiempo. Sin embargo, algunos autores consideran que la carcinogenesis experimental inducida por un cuerpo extraño tiene su contrapartida en el hombre en algunos sitios específicos, como ser la vescícula en relación a la formación de cristales de colesterol (91,151), la vejiga urinaria con la

esquistosomiasis crónica (156) y el pulmón después de la exposición a asbestos (156-158). Las similitudes consisten en la inducción de una fibrosis crónica por las fibras de asbestos, los cristales de colesterol o los huevos Schistosoma. En estos casos, el uso del acetato de medroxiprogesterona podría tener un efecto potencialmente preventivo en el hombre inhibiendo la formación de la fibrosis alrededor del cuerpo extraño. Ya que se ha demostrado los efectos antiinflamatorios de los progestágenos, es muy probable que inhiban la inducción de tumores por cuerpo extraño, disminuyendo la fibrosis alrededor del mismo; muchos autores (91,104,101) han sugerido que el grado de fibrosis alrededor del cuerpo extraño está correlacionado con la incidencia de sarcomas.

Un resultado inesperado fue la aparición de adenocarcinomas mamarios en hembras tratadas con MPA. El poder carcinogénico de los progestágenos no está bien establecido; existen algunos trabajos que demuestran que el tratamiento con estas hormonas lleva al desarrollo de tumores de mama, pero los resultados no son todavía claros (159). Bischoff y Bryson (160) demostraron que no hubo incremento de la incidencia tumoral cuando ratones hembras de la cepa Marsh fueron inoculados con 5 mg de AMP por vía intramuscular a los 3 meses de edad, repitiendo esta dosis un mes después en el flanco contralateral, los animales siguieron en observación durante 20 meses. En perras Beagle, Finkel y col (160) observaron un aumento en el número de nódulos mamarios cuando administraron 2,5 ó 62,5 mg/kg de AMP cada tres meses; con la dosis más alta también encontraron mayor incidencia tumoral que en los controles. Nagasawa y col (162) sugirieron que la progesterona actuaba estimulando la formación de nódulos alveolares hiperplásicos pre-cancerosos en ratones hembras de la cepa SHN portadoras del virus de tumor de mama. Pavelic y col (145) demostraron que la progesterona estimulaba el crecimiento de un carcinoma

de mama aplástico en ratones de la cepa CBA. Sluyser y col (163) indujeron tumores de mama con estrógenos y progesterona en ratones ovariectomizados de la cepa GR; casi todos los tumores demostraron ser hormonorespondedores a pesar que después de varios pasajes se habían transformado en hormonoindependientes. Ninguna de las dos hormonas por sí sola fue capaz de inducir tumores.

En la mujer, se llevaron a cabo estudios epidemiológicos sobre el desarrollo de nódulos de mama por un lado y sobre el desarrollo de displasias y carcinoma de cervix uterino, por el otro. Los resultados fueron controvertidos y difíciles de interpretar, principalmente por problemas metodológicos (159). Recientemente, en los Estados Unidos se ha prohibido el uso de MPA-Depo como método anticonceptivo porque las estadísticas sugieren que en aquellos países donde está permitido su uso hay un incremento en la incidencia de tumores de mama y de endometrio, potencialmente relacionado con el uso de la hormona (164).

En nuestros experimentos, una observación que se hizo al hacer la autopsia de los animales portadores de un adenocarcinoma de mama fue la hipertrofia de las glándulas salivales. Se ha descrito que en hembras y en machos castrados, el MPA se une al receptor de andrógenos en forma muy eficiente e induce la secreción del factor de crecimiento epidérmico (165). Esta observación coincide con el hecho de que en los machos no apareció ningún tumor de este tipo, solamente se los observó en hembras. Dado que el número de hembras utilizadas en este experimento fue escaso, en el momento actual se lo está repitiendo en un mayor número. Los resultados preliminares confirman nuestras observaciones anteriores. Esto tendría mucha importancia dado que el MPA no sólo es usado en la terapia de tumores hormono-dependientes sino que en muchos países es utilizado indiscriminadamente como método anticonceptivo y se está comenzando a usar en el tratamiento de fibromatosis agresivas.

C O N C L U S I O N

De este trabajo de tesis podemos concluir que:

- 1) In vivo, el acetato de medroxiprogesterona (MPA), inhibió el crecimiento de un fibrosarcoma y de una leucemia linfoblástica murina cuando fueron transplantados junto con 50 mg de la hormona (depot). Cuando el MPA se administró 3 ó 7 días después del tumor, si bien aumentó la latencia de aparición de los tumores y la latencia de muerte, los resultados no son contundentes porque a veces el excipiente ejerció el mismo efecto. Con respecto al carcinoma epidermoide indiferenciado, el MPA no alteró la incidencia tumoral, sólo produjo un retardo del crecimiento del tumor.
- 2) In vitro, los cultivos de fibroblastos tanto embrionarios como tumorales fueron más sensibles a altas concentraciones de progesterona ($10^{-4}M$) y de MPA ($5 \times 10^{-5}M$) que las células epiteliales de las líneas celulares WISH y HELA. En cuanto al efecto citostático de la progesterona, a pesar de que se inhibió la proliferación de ambos tipos celulares, en las concentraciones más altas, los fibroblastos fueron más sensibles. Esta mayor sensibilidad fue más evidente cuando se analizó el efecto citolítico de la hormona: sólo los fibroblastos fueron alterados por concentraciones altas de progesterona. Aunque no se hicieron muchos estudios para evaluar el mecanismo de acción, parecería que se trata de un proceso a nivel de membrana plasmática y no a la unión de receptores para progesterona o glucocorticoides.
- 3) El MPA disminuyó la incidencia de sarcomas inducidos por cuerpo extraño cuando fue inoculado en la vecindad de un cilindro de vidrio implantado subcutáneamente en ratones BALB/c, o en el flanco contralateral. La acción de la hormona fue más efectiva cuando se la administró in situ ya que en este caso también fue menor el ritmo de aparición de los tumores.
- 4) Inesperadamente, el MPA indujo la aparición de adenocarcinomas en hembras de la cepa BALB/c y portadoras de un cilindro de vidrio.

R E S U M E N

El objetivo de este trabajo surgió de la observación de que la progesterona tiene efectos antifibromatogénicos en cobayos y en el hombre. Se evaluó el efecto de la progesterona y del acetato de medroxiprogesterona (MPA) sobre el crecimiento de un fibrosarcoma murino tanto *in vivo* como *in vitro*. También se estudió su efecto sobre la inducción de sarcomas originados por la implantación subcutánea de un cuerpo extraño (cilindro de vidrio).

In vivo, los resultados obtenidos demuestran que el MPA disminuyó la incidencia tumoral cuando se lo inoculó junto con el trasplante de fibrosarcoma. Cuando el tratamiento hormonal se comenzó días después del inóculo tumoral no hubo efecto sobre su crecimiento. Se obtuvieron resultados similares con un trasplante de una leucemia linfoblástica mientras que no se observó una disminución en la incidencia tumoral con un carcinoma epidermoide indiferenciado.

In vitro, también se demostró que los fibroblastos tanto embrionarios como tumorales fueron más sensibles a concentraciones altas (10^{-5} - 10^{-4} M) de progestágenos que las células epiteliales que constituyen las líneas celulares WISH y HELA. Sobre fibroblastos normales y tumorales la progesterona no sólo tuvo un efecto citostático sino que también por encima de 10^{-4} M se observó un efecto citolítico. Con MPA sólo se pudo evaluar el efecto citostático ya que no se pudieron obtener concentraciones superiores a 7×10^{-5} M. Este efecto fue específico para fibroblastos ya que las células WISH no se inhibieron aún con las altas concentraciones de hormona. En base a la alta concentración de la hormona se postula una acción directa, no mediada por receptores sobre las células tumorales tanto *in vivo* como *in vitro*.

En cuanto al efecto del MPA sobre la tumorigénesis por cuerpo extraño, se observó una disminución en la incidencia de sarcomas

inducidos por la implantación subcutánea de un cilindro de vidrio. Esta disminución fue más evidente cuando se inoculó la hormona en la vecindad del cuerpo extraño que en el flanco contralateral; en el primer caso no sólo disminuyó la incidencia tumoral sino que también fue menor el ritmo de aparición de los sarcomas. Se postula que el efecto inhibidor del MPA sobre la inducción de sarcomas se debería a una disminución en la fibrosis que rodea al cuerpo extraño. Un resultado inesperado, pero de gran relevancia debido al uso indiscriminado de esta hormona, fue la aparición de adenocarcinomas en hembras portadoras de cilindro de vidrio y tratadas con MPA ya sea in situ o en el flanco contralateral.

Se puede concluir que si bien los progestágenos tienen un efecto antifibromatogénico, su administración prolongada puede llevar al desarrollo de adenocarcinomas.

C. Pappalini

M. L. M.

B I B L I O G R A F I A

1. Lipschütz A: Bases endócrinas experimentales de la tumorigenesis epitelial y conjuntiva en la esfera genital femenina. Medicina (Bs Aires) 2: 404, 1942.
2. Lipschütz A: Steroid hormones and tumors. Willams & Wilkins, Philadelphia, 1950.
3. Nagel EM: Histopathology of estrogen-induced tumors in guinea pigs. J Natl Cancer Inst 10: 1043, 1950.
4. Lanari A, Quesada A, Paz RA: Sorprendente efecto terapéutico de la progesterona en un caso de fibromatosis mediastinal. Medicina (Bs Aires) 36: 281, 1976.
5. Lanari A, Molinas F, Castro Ríos M, Paz RA: Eficaz tratamiento de diversas fibromatosis con progesterona. Medicina (Bs Aires) 38: 123, 1978.
6. Lanari A: Progesterona en fibromatosis y arterioesclerosis. Medicina (Bs Aires) 39: 826, 1979.
7. Lanari A: Effect of progesterone on desmoid tumors (aggressive fibromatosis). N Engl J Med 30: 1523, 1983.
8. Dosne C: Inactivation of antifibromatogenic substances (progesterone and desoxycorticosterone acetate) in the liver. Cancer Res 4: 512, 1944.
9. Lipschütz A, Bruzzzone S, Fuenzalida F: Comparative antifibromatogenic activity of progesterone and related artificial steroids. Cancer Res 4: 179, 1944.
10. Lipschütz A, Maas M: Progesterone treatment of uterine and other abdominal fibroids induced in the guinea pig by alpha estradiol. Cancer Res 4: 18, 1944.

11. Enzinger FM, Weiss SW: Fibromatosis. En: Tumores de tejidos blandos. pag. 57-85. Edición Panamericana. Bs. As. 1985.
12. Berliner DL, Dougherty TF: Hepatic and extrahepatic regulation of corticosteroids. Pharmacol Rev 13: 329, 1961.
13. Ruhmann AG, Berliner DL: Effect of steroids on growth of mouse fibroblasts in vitro. Endocrinology 76: 916, 1965.
14. Claman HN: Corticosteroids and lymphoid cells. N Engl J M 287: 388, 1972.
15. Bywaters EGL: Treatment of fibrosis. Failure of corticosteroids to prevent fibrosis. Ann Rheum Dis 36 (Supl) 57, 1977.
16. Kunkel WM, Clagett O, Mc Donald GR: Mediastinal granuloma. J Thorac Surg 27: 565, 1954.
17. Longmire P, Woodwin WE, Buckberg GD: Management of sclerosing fibrosis of the mediastinal and retroperitoneal areas. Ann Surg 165: 1013, 1967.
18. Brush MG: Biochemical aspects of endometrial cancer; a background to endocrine therapy. In: Progestogens in the management of hormone responsive carcinomas. RW Taylor (ed). The Medicine Publishing Foundation. Oxford UK, 1980, p. 19.
19. Lober J, Mourisden HT, Rose C: Oral or intramuscular treatment of advanced breast cancer with medroxyprogesterone acetate in endocrine related tumors. Vol 11. L. Campio, G Robustelli Della Cuna, RW Taylor (eds). Raven Press. New York, 1983, p. 105.

20. Pannuti F, Di Marco AR, Martoni A, Fruet F, Strocchi E, Burrioni P, Rossi AP, Cricca A: Medroxyprogesterone acetate in treatment of metastatic breast cancer: Seven years of experience. In: Role of medroxyprogesterone acetate in endocrine related tumors. S Iacobelli, A Di Marco (eds), Raven Press, New York, 1980. p. 20
21. Lasley BL, Wang CF, Yen SSC: The effects of estrogen and progesterone on the functional capacity of the gonadotrophins. *J Clin Endocrinol Metab* 41: 820, 1975.
22. Stites DP, Siiteri PK: Steroids as immunosuppressants in pregnancy. *Immunol Rev* 75: 117, 1983.
23. Marsch JM, Butcher RW, Savard K, Sutherland EW: The stimulatory effect of luteinizing hormone on adenosine 3'5' monophosphate accumulation in corpus luteum slices. *J Biol Chem* 241: 5436, 1966.
24. Rao BR, Wiest NS, Allen WM: Progesterone receptor in rabbit uterus. I. Characterization and estradiol 17 beta augmentation. *Endocrinology* 92: 1229, 1978.
25. Walters MR, Clark JH: Cytosol and nuclear compartmentalization of progesterone receptors in the rat uterus. *Endocrinology* 103: 601, 1978.
26. Clark JH, Hsueh AJW, Peck EJ: Regulation of estrogen receptor replenishment by progesterone. *Ann NY Acad Sci* 286: 161, 1977.
27. Siiteri PK, Febres F, Clemens LE, Chang RJ, Gondos B, Stites D: Progesterone and maintenance of pregnancy; is progesterone nature's immunosuppressant? *Ann NY Acad Sci* 286: 384, 1977.
28. Sweat ML, Bryson MJ: Metabolism of progesterone in human proliferative endometrium. *Endocrinology* 81: 729, 1967.

29. Ganong WF. Manual de Fisiología. El Manual moderno S.A. (ed) Mexico, 1980
30. Hooker CW, Forbes TR: Specificity of the intrauterine test for progesterone. Endocrinology 45: 71, 1949.
31. Wright F, Giacomini M: Reduction of dihydrotestosterone to androstenedioles by human female skin in vitro. J Steroid Biochem 13: 639, 1980.
32. O'Malley B, Mc Guire WL: Studies on the mechanisms of action of progesterone in regulation of the synthesis of specific proteins. J Clin Invest 47: 654, 1968.
33. Janne OA, Isomaa VV, Torkkeli TK, Isotalo HE, Kopu HT: Hormonal regulation of uteroglobin synthesis in the rabbit uterus. In: Progesterone and Progestins, CW Bardin, E Milgrom, P Mauvais-Jarvis (eds). Raven Press, New York, 1983.
34. Menne C, Suske G, Arnemann J, Wenz M, Cato ACB, Beato M: Isolation and structure of the gene for the progesterone inducible protein uteroglobin. Proc Natl Acad Sci 79: 4853, 1982.
35. Welsohns WV, Lieberman ME, Gorski J: Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. Nature 307: 74, 1984.
36. Press MF, Greene GL: An Immunocytochemical method for demonstrating estrogen receptor in human uterus using monoclonal antibodies to human estrophilin. Lab Invest 50: 480, 1984.
37. Feldman D, Funder JW, Edelman IS: Subcellular mechanism in the action of adrenal steroids. Am J Med 53: 545, 1972
38. Edelman IS: Mechanism of action of steroid hormones. J Steroid Biochem 6: 147, 1975.

39. Baxter JD, Harris AW: Mechanism of glucocorticoid action. General features with reference to steroid mediated immunosuppression. *Transpl Proceedings* 7: 55, 1975.
40. Munck A, Wira C, Young DA, Mosher KM, Hallahan C, Bell PA: Glucocorticoid-receptor complexes and the earliest steps in the action of glucocorticoids on thymus cells. *J Steroid Biochem* 3: 567, 1972.
41. Russo-Marie F, Duval D: Dexamethasone-induced inhibition of prostaglandin production does not result from a direct action on phospholipase activities but is mediated through a steroid inducible factor. *Biochem Biophys Acta* 712: 177, 1982.
42. Lippman M, Huff K, Bolan G: Progesterone and glucocorticoid interactions with receptor in breast cancer cells in long-term tissue culture. *Ann NY Acad Sci* 286: 101, 1977.
43. Schuetz AW: Control mechanisms in oocyte growth and maturation. *J Steroid Biochem* 11: 695, 1979.
44. Baulieu EE, Godeau F, Schorderet M: Steroid-induced meiotic division in *Xenopus laevis* oocytes: surface and calcium. *Nature* 275: 593, 1978.
45. Selye H: Anesthetic effect of steroid hormones. *Proc Soc Exp Biol Med* 46: 116, 1941.
46. Clark JH, Hsueh AJW, Peck EJ: Regulation of estrogen receptor replenishment by progesterone. *Ann NY Acad Sci* 286: 161, 1977.
47. Tseng L: Steroid specificity in the stimulation of human endometrial estradiol dehydrogenase. *Endocrinology* 102: 1398, 1978.

48. Tseng L, Gurpide E: Induction of human endometrial estradiol dehydrogenase by progestins. *Endocrinology* 102: 1398, 1978.
49. Wahavisan R, Gorell TA: Steroidal control of rat uridine 17 beta hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Steroids* 36: 115, 1980.
50. Gerschenson LE, Conner E, Murai JI: Regulation of cell by diethylstilbestrol and progesterone in cultured endometrial cells. *Endocrinology* 100: 1468, 1977.
51. Ishiwata I, Wdagawa Y, Nozawa S: Effects of progesterone on human endometrial carcinoma cells in vivo e in vitro. *J Natl Cancer Inst* 60: 947, 1978.
52. Bassler R: The morphology of hormone induced structural changes in the female breast. In: *Current topics in Pathology*, pag. 1-89, Springer Verlag, Berlin 1970.
53. Cowie AT, Folley SJ, Malpress FH, Richardson KC: Studies on the hormonal induction of mammary growth and lactation in the goat. *J Endocrinol* 8: 64, 1952.
54. Mc Ewen BS, Davis PG, Gerlach JL, Krey LC, Mac Lusky NJ, MC Ginnis MY, Parsons B, Rainbow TC: Progestin Receptors in the Brain and Pituitary Gland. In: *Progesterone and progestins*, CW Bardin, E Milgrom, P Mauvais-Jarvis (eds) Raven Press, New York, 1983.
55. Liao S: Molecular actions of androgens. In: *Biochemical Actions of Steroid Hormones*. E. Litvack (ed) pag. 351-406. Academic press, New York, 1977.
56. Voigt W, Fernandez EP, Hsia SL: Transformation of testosterone into 17 beta hydroxy-5 alfa androstan- 3 one by microsomal preparations of human skin. *J Biol Chem* 245: 5594, 1970.

57. Wright F, Kirchoffer MO, Mauvais-Jarvis P. Antagonist action of dihydroprogesterone in the formation of the specific dihydrotestosterone cytoplasmic complex in rat ventral prostate. *J Steroid Biochem* 10: 419, 1979.
58. Wright F, Giacomini M: Reduction of dihydrotestosterone to androstenediols by human females skin in vitro. *J. Steroid Biochem* 13: 639, 1980.
59. Landau RL, Lugibihl K: The metabolic and natriuretic effects of progesterone in man. *Recent Prog Hormone Res* 17: 249, 1961.
60. Wambach G, Higgins J: Antimineralocorticoid action of progesterone in the rat: Correlation of the effect on electrolyte excretion and interaction with renal mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* 102: 1686, 1978.
61. Mauvais-Jarvis P: Progesterone and Progestins: A general Overview. In: Progesterone and Progestins. CW Bardin, Milgrom and Mauvais-Jarvis P (eds). Raven Press, New York, 1983.
62. Ruggiero R, Bonfil RD, Pasqualini CD: Etiología del cáncer: Hacia una teoría unificada. *Sangre* 29: 52, 1984.
63. Bloom HJG, Ducker CE, Mitchley BCV: Hormone-dependent tumours of the kidney. *Br J Cancer* 17: 611, 1963.
64. Horning ES: Observations on hormone-dependent renal tumours in the golden hamster. *Br J Cancer* 10: 678, 1956.
65. Letourneau RJ, Li JJ, Rosen S, Vिलlee CA: Junctional Specialization in estrogen-induced renal adenocarcinomas of the golden hamster. *Cancer Res* 35: 6, 1975.
66. Li JJ, Talley DJ, Li SA, Vилlee CA: An estrogen binding protein in the renal cytosol of intact, castrated and estrogenized golden hamster. *Endocrinology* 95: 1134, 1974.

67. Bojar H, Dreyfurst R, Balzer K, Staib W, Wittliff JL: Estrogen-binding components in human renal cell carcinoma. *J Clin Chem Clin Biochem* 14: 521, 1976.
68. Concolino G, Marocchi A, Conti C, Tenaglia R, Di Silverio F, Bracci V: Human renal cell carcinoma as a hormone dependent tumor. *Cancer Res* 38: 4340, 1978.
69. Concolino G, Marocchi A, Di Silverio F, Conti C: Progestational therapy in human renal carcinoma and steroid receptors. *J Steroid Biochem* 7: 923, 1976.
70. Li JJ, Talley DJ, Li SA, Villee CA: Receptor characteristics of specific estrogen binding in the renal adenocarcinoma of the golden hamster. *Cancer Res* 36:1127, 1976.
71. Gardner WV: Hormonal imbalances in tumorigenesis. *Cancer Res* 8: 397, 1948.
72. Allen E: Estrogenic hormones in the genesis of tumors and cancer. *Endocrinology* 30: 942, 1942.
73. Geschickter CF, Byrnes EW: Factors influencing the development and time of appearance of mammary cancer in the rat response to estrogen. *Arch Path* 33: 334, 1942.
74. Babcock YV, Gustelle S, Heve NH, Hogg YA, Stucy YC, Barner LE, Dulin WE: 6 α -Methyl-17 α -hydroxy-progesterone 17 acylates; a new class of potent progestins. *J Am Chem Soc* 80: 2904, 1958.
75. Anderson DG: Management of advanced endometrial adenocarcinoma with medroxyprogesterone acetate. *Am J Obst. Gynecol* 92: 87, 1965.
76. Ganzina F: High dose medroxyprogesterone acetate (AMP) treatment in advanced breast cancer. A Review. *Tumori* 65: 563, 1979.

77. Iacobelli S, Di Marco A: Role of medroxyprogesterone in endocrine related tumors. Raven Press, New York, 1980.
78. Di Marco A: The antitumor activity of 6 alfa methyl 17 alfa acetoxyprogesterone (MPA) in experimental mammary cancer. In: Role of medroxyprogesterone in endocrine related tumors. S Iacobelli, Di Marco A (eds). Raven Press, New York, 1980.
79. Lippman ME, Bolan G, Huff K: The effects of androgens and antiandrogens on hormone-responsive human breast cancer in long term tissue culture. Cancer Res 36: 4610, 1976.
80. Horwitz KB, Costolow ME, Mc Guire WL: MCF-7, a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone and glucocorticoid receptors. Steroids 26: 785, 1975.
81. Lippman ME, Bolan G, Monaco ME, Pinkus L, Engel L: Model systems for the study of estrogen action in tissue culture. J Steroid Biochem 7: 1045, 1976.
82. Leung BS: In: Endocrine control in neoplasia. RK Sharma WE Criss (eds) Raven Press, New York, 1978. pag 209-231.
83. Horwitz KB, Mc Guire WL: Estrogen control of progesterone receptors in human breast cancer. Correlation with nuclear processing of estrogen receptors. J Biol Chem 253, 2223, 1978.
84. Iacobelli S, Sica G, Natoli C, Gatti D: Inhibitory effects of medroxyprogesterone acetate on the proliferation of human breast cancer cells. In: Role of medroxyprogesterone acetate in endocrine related tumors. Vol. 11. L Campio, G Robustelli Della Cuna, RW Taylor (eds). 1983.

85. Mc Guire WL, Horwitz KB: In: Hormones receptors and breast cancer. Mc Guire WL (ed) Raven Press, New York 1978, pag 31-42.
86. Pellegrini A, Massida B, Mascia V, Lippi MG, Ionta MT, Muggiano A, Carboni-Boi E: Aspects of the rationale to hormone and hormono chemotherapy in advanced breast cancer. In: Role of medroxyprogesterone acetate in endocrine related tumors. S Iacobelli S, Di Marco A (eds) Raven Press, New York 1980.
87. Iacobelli S, Longo P, Scambia G, Natoli V, Sacco F: Progesterone receptors and hormone sensitivity of human endometrial carcinoma. In: Role of medroxyprogesterone acetate in endocrine related tumors. S Iacobelli, Di Marco A (eds). New York, 1980.
88. Lippman ME, Bolan G, Huff K: The effects of glucocorticoids and progesterone on hormone responsive human breast cancer in long term tissue culture. Cancer Res 36: 4602, 1976.
89. Castegnaro E, Sala G: Isolation and identification of 6 β , 17 α , 21 trihydroxy- 6 α -methyl y pregnene-3, 20 dione (21-acetate) from the urine of human subjects treated with 6 α methyl-17- α - acetoxypregesterone. J Endocrinol 21: 445, 1962.
90. Danguy A, Legros N, Devleeschouwer N, Heuson Stennon JA, Heuson JC: Effects of medroxyprogesterone acetate (MPA) on the growth of DMBA induced rat mammary tumors histopathological and endocrine studies. In: Role of medroxiprogesterone acetate in endocrine related tumors. S Iacobelli, Di Marco A (eds). New York, 1980.
91. Bischoff F, Bryson G: Carcinogenesis through solid state surfaces. Progr Exp Tumor Res 5: 85, 1964.

92. Farber E, Cameron R: The sequential analysis of cancer development. *Advances in Cancer Research* 31: 125, 1964.
93. Potter M: Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. *Physiol Rev* 52: 631, 1972.
94. Heston WE: Genetic analysis of susceptibility to induced pulmonary tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 3: 69, 1942.
95. Brand I, Buoen LC, Brand KG: Foreign body tumors of mice. Strain and sex differences in latency and incidence. *J Natl Cancer Inst* 58: 1443, 1977.
96. Merwin RM, Algire GH: Induction of plasma cell tumors and sarcomas in mice by diffusion chambers placed in the peritoneal cavity. *J Natl Cancer Inst* 31: 998, 1963.
97. Johnson KH, Ghobrial HKG, Buoen LC, Brand I, Brand KG: Nonfibroblastic origin of foreign body sarcomas implicated by histological and electron microscopic studies. *Cancer Res.* 33: 3139, 1973.
98. Brand KG, Buoen LC, Brand I: Antigen-Deficient cell variants in preneoplastic foreign body reaction in mice. *J Natl Cancer Inst* 49: 459, 1972.
99. Johnson KH, Ghobrial HKG, Buoen LC, Brand I, Brand KG: Ultrastructure of cell types cultured during preneoplasia from implant surfaces and foreign body reactive tissues in mice. *J Natl Cancer Inst* 64: 1383, 1980.
100. Brand KG, Buoen LC, Brand I: Foreign body tumorigenesis. Timing and location of preneoplastic events. *J Natl Cancer Inst* 47: 829, 1971.
101. Brand KG, Buoen LC, Johnson KH, Brand I: Etiological factors, stages and the role of the foreign body in foreign body tumorigenesis: A Review. *Cancer Res* 35: 279, 1975.

102. Johnson KH, Ghobrial HK, Buoen LC, Brand I, Brand KG: Foreign body tumorigenesis in mice: Ultrastructure of the preneoplastic tissue reactions. J Natl Cancer Inst 49: 1311, 1972.
103. Brand KG, Buoen LC, Brand I: Carcinogenesis from polymer implants: New aspects from Chromosomal and transplantation studies during premalignancy. J Natl Cancer Inst 39: 663, 1967
104. Bates RB, Klein M: Importance of a smooth surface in carcinogenesis by plastic film. J Natl Cancer Inst 37: 145, 1966.
105. Takakura K, Yamada H, Weber AH, Hollander VP: Studies on the pathogenesis of plasma cell tumors: effect of sex hormones on the development of plasma cell tumor. Cancer Res: 27 Part 1: 932, 1967.
106. Michelich VJ, Brand KG: Effects of gonadectomy on foreign body tumorigenesis in CBA/H mice. J Natl Cancer Inst 64: 807, 1980.
107. Colburn P, Buonassisi V: Estrogen binding sites in endothelial cell cultures. Science 201: 817, 1978.
108. Jackson DS: I Development of fibrosis. Cell proliferation and collagen biosynthesis. Ann rheum dis 36 Supl 2: 2, 1977.
109. Bailey AJ, Bazin S, Delaunay A: Changes in the nature of the collagen during the development and resorption of granulation tissues. Biochem Biophys Acta (Amst) 328: 383, 1973.
110. Bailey AY: Some aspects of collagen maturation and fibrosis. Ann rheum Dis 36 Supl 2: 5, 1977.
111. Aalto M, Potila M, Kulonen E: The effect of silica-

- treated macrophages on the synthesis of collagen and other proteins in vitro. *Exp Cell Res* 97: 193, 1976.
112. Allison AC, Clark IA, Davies P: Cellular interactions in fibrogenesis. *Ann rheum Dis Supl* 2; 36:8, 1977.
113. Hart PH, Powell W, Cooksley WGE, Halliday JW: Mononuclear cell factors that inhibit fibroblast collagen synthesis. *Scand J Immunol* 18: 41, 1983.
114. Pierce JA, Resnick H, Henri PH: Metabolism of collagen and elastin in the rat. *Clin Res* 12: 46, 1964.
115. Ryan JN, Woessner JR: Estradiol inhibition of collagenase role in uterine involution. *Nature* 248: 526, 1974.
116. Jeffrey JJ, Koob TJ, Eisen AZ: Hormonal regulation of mammalian collagenases. In: Dynamics of connective tissue macromolecules. Burleigh PMC, Poole AR (eds) pag 147. North Holland, Amsterdam.
117. Krohn PL: The effect of steroid hormones on the survival of skin homografts in the rabbit. *J Endocrin* 11: 78, 1954.
118. Hulka JF, Mohr K, Lieberman MW: Effect of synthetic progestational agents on allograft rejection and circulating antibody production. *Endocrinology* 77: 897, 1965.
119. Medawar PB, Sparrow EM: The effect of adrenocortical hormones adrenocorticotrophic hormone and pregnancy on skin transplantation immunity in mice. *J Endocrinol* 14: 240, 1977.
120. Moriyama I, Sugawa T: Progesterone facilitates implantation of xenogeneic cultured cells in hamster uterus. *Nature New Biology* 236, 150, 1972.

121. Turcotte JG, Havies RF, Brody GL, Meyer TJ, Schwartz SA: Immunosuppression with medroxyprogesterone acetate Transplantation 6: 248, 1968.
122. Atkinson RM, Jenkins L, Tomich EG, Woollett EA: The effects of some anti-inflammatory substances on carragenin-induced granulomata. J Endocrinol 25: 87, 1962.
123. Nakagawa H, Min KR, Nanjo K, Tsurufuji S: Anti-inflammatory action of progesterone on carragenin induced inflammation in rats. Jpa J Pharmacol 29: 509, 1979.
124. Maurer JH, Bonaventura LM: The effect of aqueous progesterone on operative adhesion formation. Fert and Ster 29: 485, 1983.
125. Garegnani T, Barcat JA, Pistoia OA, Lanari A: Acción de la progesterona en la organización de adherencias pleurales experimentales. Medicina (Bs As) 53: 117, 1983.
126. Neifield JO, Tormey CD: Effects of steroid hormones on phytohemagglutinin stimulated human peripheral blood lymphocytes. Transplantation 27: 309, 1979.
127. Mori T, Kobayashi H, Nishimoto H, Suzuki A, Mori T: Inhibitory effect of progesterone and 20 alfa hydroxypregn-4-en-3-one on the phytohemagglutinin induced transformation of human lymphocytes. Am J Obst Gynecol 127: 151, 1977.
128. Wyle FA, Kent JR: Immunosuppression by sex steroid hormones. I. The effect upon PHA and PPD Stimulated lymphocytes. Clin Exp Immunol 27: 407, 1977.
129. Kobayashi H, Mori T, Suzuki A, Nishimura T, Nishimoto H, Harada M: Suppression of mixed lymphocyte reaction by progesterone and estradiol 17. Am J Obst and Gynecol 134: 255, 1979.

130. Clemens E, Siiteri PK, Stites DP: Mechanism of immunosuppression of progesterone on maternal lymphocyte activation during pregnancy. *J Immunol* 122: 1978, 1979.
131. Pavia C, Siiteri PK, Perlman JD, Stites DP: Suppression of murine allogeneic cell interactions by sex hormones. *J Reprod Immunol* 1: 33, 1979.
132. O'Hearn M, Stites DP: Inhibition of murine suppressor cell function by progesterone. *Cell Immunol* 77: 340, 1983.
133. Holdstock G, Chastenay BF, Krawitt EL: Effects of testosterone oestradiol and progesterone on immune regulation. *Immunol* 47: 449, 1982.
134. Stimson WH: Identification of pregnancy associated alpha macroglobulin on the surface of peripheral blood leukocyte populations. *Clin Exp Immunol* 28: 445, 1977.
135. Stites DP, Bugbee S, Siiteri PK: Differential actions of progesterone and cortisol on lymphocyte and monocyte interactions during lymphocyte activation-relevance to immunosuppression in pregnancy. *J Rep Immunol* 5: 215, 1983.
136. Schiff RI, Mercier D, Buckley KH: Inability of gestational hormones to account for the inhibitory effects of pregnancy plasma on lymphocytes responses in vitro. *Cell Immunol* 20: 69, 1975.
137. Tomoda Y, Fuma M, Miura T, Saka N, Ishikawa N: Cell mediated immunity in pregnant women. *Gynecol Invest* 7: 280, 1976.
138. Stimson WH, Crilly PJ: Effects of steroids on the secretion of immunoregulatory factors by thymic epi-

- thelial cultures. *Immunology* 44: 401, 1981.
139. Stimson WH: The influence of pregnancy associated serum proteins and steroids on the maternal immune response. In: *Immunobiology of reproduction*. T Wegmann, T Gill (eds). 1983, pag. 281.
 140. Pasqualini CD, Sen L, Saal F, Schwartz L, Tkaczewski LZ: Tumor development in mice bearing a plastic cylinder and inoculated with human neoplastic cells. *J Natl Cancer Inst* 51: 283, 1973.
 141. Covelli V, Di Majo V, Bassani B, Silini G, Metalli P: Role of the spleen in spontaneous reticulum cell sarcoma of (C57Bl/Cne x C3H/Cne)F1 mice. *J Natl Cancer Inst* 64: 139, 1980.
 142. Sokal RR, Rohlf, FJ: *Introducción a la Bioestadística*. Ed. Reverté, Barcelona, 1980, pag 208.
 143. Munck A, Brinck-Johnsen T: Specific and non specific physicochemical interactions of glucocorticoids and related steroids with rat thymus cells in vitro. *J Biol Chem* 243, 5556, 1968.
 144. Gross J, Azizkhan RG, Biswas C, Bruns RR, Hsieh DT, Folkman J : Inhibition of tumor growth, vascularization and collagenolysis in the rabbit cornea by medroxyprogesterone. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 1176, 1981.
 145. Pavelic K, Petrusic LJ, Osmak M, Culo F : In vivo and in vitro effect of progesterone on the growth of some mouse and human tumors. *Res Exp Med* 183: 183, 1983
 146. Markham RB, White A, Goldstein AL: Selective immunosuppressive activity of steroids in mice inoculated with

- the Moloney sarcoma virus. Proc Soc Exp Biol Med 148: 190, 1975.
147. Klein E, Klein E: Rejectionability of virus induced tumors and non rejectionability of spontaneous tumors. A lesson in contrasts. Transplant Proc 9: 1095, 1977.
 148. Klein G, Sjogren HO, Klein E, Hellstrom KE: Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. Cancer Res 20: 1561, 1960.
 149. Ruggiero RA, Bustuoabad OD, Bonfil RD, Meiss RP, Pasqualini CD: "Concomitant immunity" in murine tumours of non detectable immunogenicity. Br J Cancer. In press
 150. Hackney JF, Holbrock NJ, Grasso RJ: Progesterone as a partial agonist in L 929 mouse fibroblasts. Effect on cell growth, glutamine synthetase induction and glucocorticoid receptors. J Steroid Biochem 14: 971, 1981.
 151. Hackney JF, Gross SR, Aronow L, Pratt WB: Specific glucocorticoid binding macromolecules from mouse fibroblasts growing in vitro: A possible steroid receptor for growth inhibition. Mol Pharmacol 6: 500, 1970.
 152. Pratt WB, Aronow L: The effect of glucocorticoids on proteins and nucleic acid synthesis in mouse fibroblasts growing in vitro. J Biol Chem 241: 5244, 1966.
 153. Duval D, Durant S, Homo Delarche F: Non genomic effects of steroids. Interactions of steroid molecules with membrane structures and functions. Biochimica et Biophysica Acta 737: 409, 1983.
 154. Withey JR: In: Origins of human cancer. H Hiatt, JD Watson, J Winsten (eds) Book A. pag 219. Cold Spring

Harbor Laboratory, New York 1977.

155. Bischoff F: Organic polymer biocompatibility and toxicology. Clin Chem 18, 869: 1972.
156. Brand KG: In: Cancer. A comprehensive treatise. F Becker (ed). Vol 1, pag 485. Plenum. New York. 1975
157. Bryson G, Bischoff F: Silicate induced neoplasms. Prog Exp Tumor Res 9: 77, 1967.
158. Bryson G, Bischoff F: The limitations of safety testing. Prog Exp Tumor Res 11: 100, 1969.
159. WHO, IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Sex Hormones (II) Vol 21: 417, IARC, Lyon, 1979.
160. Bischoff F, Bryson G: Medroxyprogesterone administration in females Marsh mice (Abstract N 9). Proc Am Assoc Cancer Res 18: 3, 1977.
161. Finkel MJ, Berliner VR: The extrapolation of experimental findings (animals to man): The dilemma of the systemically administered contraceptives. Bull Soc pharmac environ pathol 4: 13, 1973.
162. Nagasawa H, Yanai R, Nakajima Y, Mori J: Effects of progesterone on normal and preneoplastic mammary development in mice in relation to prolactin and estrogen Europ J Cancer 16: 1069, 1980.
163. Sluyser M, Van Nie R: Estrogen Receptor content and hormone responsive growth of mouse mammary tumors. Cancer Res 34: 3253, 1974.
164. WHO, Breast Cancer, cervical cancer and depot medroxyprogesterone acetate. The Lancet 1207: 1984.

165. Wayne Bardin C: The androgenic, antiandrogenic and synandrogenic actions of progestins. In: Progesterone and Progestins. Wayne Bardin C, Milgrom E, Mauvais-Jarvais P (eds). Raven Press, New York, 1983.